

AUS DEM MED. ZENTRUM FÜR OPERATIVE MEDIZIN
DER PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG
KLINIK FÜR NEUROCHIRURGIE
DIREKTOR: UNIV.-PROF. DR. MED. H. BERTALANFFY

**CHARAKTERISIERUNG
MOLEKULARGENETISCHER PROGNOSEFAKTOREN
AUF DEM KURZEN ARM DES CHROMOSOMS 1
IN HUMANEN MENINGEOMEN**

INAUGURALDISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER GESAMTEN MEDIZIN
DEM FACHBEREICH HUMANMEDIZIN DER PHILIPPS-UNIVERSITÄT
MARBURG

VORGELEGT VON
CHRISTINE LINDNER
AUS WÜRZBURG

MARBURG 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 04.11.2004.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereich.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. H. Bertalanffy

Koreferent: HD Dr. rer. nat. J. Kunz

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2	EINLEITUNG	4
2.1	Problemstellung	4
2.2	Bedeutung klinischer Parameter für das Wachstumsverhalten von Meningeomen	5
2.2.1	<i>Alter</i>	5
2.2.2	<i>Geschlecht</i>	5
2.2.3	<i>Lokalisation und Tumorgroße</i>	6
2.2.4	<i>Infiltration und peritumorales Ödem</i>	7
2.2.5	<i>Ätiologie</i>	8
2.2.6	<i>Radikalität der Resektion</i>	8
2.3	WHO-Klassifikation meningealer Tumoren	9
2.3.1	<i>Histopathologische Kriterien</i>	9
2.3.2	<i>Proliferationskinetische Kriterien</i>	10
2.4	Genetische Veränderungen bei Meningeomen	11
2.4.1	<i>Die Rolle des Chromosoms 22</i>	12
2.4.2	<i>Chromosomale Veränderungen außerhalb Chromosom 22</i>	15
2.4.3	<i>1p- Deletionen</i>	16
2.4.4	<i>Kartierungsversuche der 1p-Deletionen</i>	18
2.4.5	<i>Identifizierung möglicher Zielgene der 1p-Deletionen</i>	19
3	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
4	MATERIAL UND METHODIK	22
4.1	Material	22
4.1.1	<i>Chemikalien und Geräte</i>	22
4.1.2	<i>Gewebe-und Blutproben</i>	23
4.1.3	<i>Untersuchte Genloci auf Chromosom 1</i>	25
4.1.4	<i>Oligonukleotide</i>	26
4.1.4.1	<i>Primer für die Reverse-Transkriptase-PCR</i>	26
4.1.4.2	<i>Oligonukleotide für die Mikrosatellitenanalyse</i>	28
4.1.5	<i>Antikörper</i>	28
4.1.6	<i>Puffer und Lösungen</i>	29
4.2	Methoden	30
4.2.1	<i>Extraktionstechniken</i>	30
4.2.1.1	<i>RNA- Extraktion</i>	30

4.2.1.2	DNA-Extraktion	30
4.2.1.3	Protein-Extraktion	31
4.2.2	Reverse-Transkriptase –PCR (RT-PCR)	31
4.2.3	Mikrosatellitenanalyse	31
4.2.4	Elektrophorese	32
4.2.4.1	Agarose-Gel-Elektrophorese	32
4.2.4.2	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) und Silberfärbung	32
4.2.5	Western-Blot	33
4.2.6	Immunhistochemie	33
4.2.6.1	Durchführung der Immunhistochemie	33
4.2.6.2	Auswertung der Immunhistochemie	34
4.2.7	Statistik	35
5	ERGEBNISSE	36
5.1	Klinische Daten zu den untersuchten Tumoren	36
5.1.1	Klinische und morphologische Daten zu den molekulargenetisch untersuchten Tumoren	36
5.1.2	Klinische und morphologische Daten zu den immunhistochemisch untersuchten Tumoren	38
5.2	Expressionsanalyse für ausgewählte 1p-spezifische Transkripte	41
5.3	Analyse der erstellten Expressionskarte	51
5.4	Protein-Expressionsanalyse für zwei progressionsassoziiert transkriptionsdefiziente Loci	54
5.5	Korrelation zwischen Transkription und Proteinexpression	59
5.5.1	ALPL	59
5.5.2	RAB3B	61
5.6	Mikrosatellitenanalyse	63
5.7	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung	65
6	DISKUSSION	67
6.1	Übersicht über die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse 1p-spezifischer Transkripte	67
6.2	Charakterisierung der einzelnen Loci und ihrer Bedeutung für Meningeomentwicklung und - progression	69
6.2.1	Loci auf 1q	69
6.2.1.1	IL-6r	69

6.2.1.2	<i>TRK</i>	70
6.2.2	<i>Gene auf 1p mit fehlender zelltypisch konstitutiver Expression und fehlender tumorspezifischer Expression</i>	70
6.2.2.1	<i>FGR</i>	70
6.2.2.2	<i>CD 30</i>	71
6.2.2.3	<i>OPRD1</i>	71
6.2.2.4	<i>NGFβ</i>	72
6.2.3	<i>Exprimierte Gene ohne Verdacht auf Involvierung in Meningeomwachstum</i>	72
6.2.3.1	<i>TNF-R2</i>	72
6.2.3.2	<i>PRKACB</i>	73
6.2.3.3	<i>JAK1</i>	73
6.2.3.4	<i>cJUN</i>	75
6.2.3.5	<i>NRAS</i>	75
6.2.4	<i>Bedeutung des Expressionsmusters von SKI</i>	76
6.2.5	<i>Zielgene der 1p-Deletionen in Meningeomen</i>	77
6.2.5.1	<i>GADD45</i>	77
6.2.5.2	<i>RAB3B</i>	78
6.2.5.3	<i>ALPL</i>	79
6.3	Molekulare Mechanismen der funktionellen Inaktivierung eines Gens und seines Produktes	81
6.4	Methodische Aspekte	83
6.5	Weitere molekulare Prognosefaktoren bei Meningeomen	84
7	ZUSAMMENFASSUNG	86
8	LITERATURVERZEICHNIS	88

DANKSAGUNG

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Einheiten sind nach dem internationalen Standard abgekürzt (SI-Einheiten). Gene werden nach Empfehlungen des „International Standing Committee on Human Gene Nomenclature“ mit Großbuchstaben *KURSIV* abgekürzt, während die Abkürzung der Proteine als Genprodukte mit normalen Großbuchstaben erfolgt.

A	Adenosin
<i>ALPL</i>	Gene of Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney-type
<i>APM-1</i>	Adipose most abundant gene transcript 1
<i>BAM22</i>	Beta-adaptin gene family member
Bp	Basenpaare
Budr	Bromodeoxyuridin
C	Cytosin
<i>CD 30</i>	CD 30 antigen (Ki-1 Antigen)
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKN2C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2c (p18)
cDNA	komplementäre DNA
CGH	Comperative genomische Hybridisierung
<i>cjun</i>	Avian sarcoma virus17 Oncogene (v-jun) homologue
<i>DAL-1</i>	differently expressed in adenocarcinomas of the lung
<i>DCC</i>	deleted in colorectal carcinoma
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTPs	2'deoxynucleosid - 5'-triphosphat - Set
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
<i>FGR</i>	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral oncogene homologue
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> Hybridisierung
G	Guanosin
<i>GADD45</i>	growth arrest and DNA damage inducible gene
H	Stunde
HPF	high power fields

HRP	Horse-raddish-peroxidase
<i>IL-6r</i>	Interleukin-6-receptor gene
IRS	Immunreaktiver Score
<i>JAK1</i>	Janus kinase 1 (protein-tyrosin-kinase)
Kb	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
<i>LARGE</i>	N-acetylglucosaminyltransferase gene family member
LOH	Loss of heterozygosity
M	Meningeom
<i>MADH2</i>	mothers against decapentaplegic homologue 2
<i>MADH4</i>	mothers against decapentaplegic homologue 4
Mb	Megabasen
Merlin	Moesin-ezrin-radixin-like protein
Min	Minuten
M-MLV RT	Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transkriptase
mRNA	messenger RNA
N	Normalgewebe
NaCl	Natriumchlorid
NF2	Neurofibromatose Typ 2
<i>NGFβ</i>	nerve growth factor, beta gene
<i>NRAS</i>	neuroblastoma RAS viral oncogene homologue
<i>OPRD1</i>	Opioid receptor, delta-1 gene
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PgR	Progesteronrezeptor
PP	Prozentsatz positiver Zellen
<i>PRKACB</i>	Protein-kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta gene
PVDF	Polyvinyliden difluorid
<i>RAB3B</i>	RAB3B Member RAS-oncogene family
<i>RAS</i>	<i>RAS</i> -oncogene
<i>RB</i>	Retinoblastom-Gen
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute

RT-PCR	Reverse transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulphate
Sec	Sekunde
SI	Färbeintensität
<i>SIL</i>	<i>TAL1 (SCL)</i> interrupting locus
<i>SKI</i>	v-SKI avian sarcoma viral oncogene homologue
Stat	Signal transducer and activator of transcription
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>TAL1</i>	T-cell acute lymphocytic leukemia 1
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA
<i>TNFR2</i>	tumor necrosis factor receptor-2 gene
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>TRK</i>	oncogene TRK
TSG	Tumorsuppressorgen
U	Unit/Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation
Wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

2 EINLEITUNG

2.1 Problemstellung

Meningeome gehören zu den häufigsten primären Neoplasien des ZNS (Greenberg, 1994). Unter den intrakraniellen Tumoren nehmen sie einen Anteil von 14 – 19% ein, unter den spinalen einen Anteil von 25%. Es handelt sich meist um benigne Tumoren, die ihren Ursprung vom Arachnothel nehmen und langsames, verdrängendes Wachstum zeigen. Sie werden dem WHO-Grad I zugeordnet. Allerdings zeigen 5–10% aller Meningeome eine hohe Proliferationstendenz und Zeichen der histologischen Entdifferenzierung. Sie werden als atypische Meningeome klassifiziert entsprechend dem WHO-Grad II. Bei einem kleinen Teil von 5% aller Meningeome finden sich deutliche Zeichen der Malignität, insbesondere Zellreichtum, hohe Proliferationsrate und Invasion des Hirnparenchyms. Diese Tumoren werden als anaplastische Meningeome bezeichnet und dem WHO-Grad III zugeordnet. Insbesondere bei atypischen und anaplastischen Meningeomen ist das Grading auf Grund histopathologischer Marker bis heute in manchen Fällen schwierig und nicht unumstritten (Niedermayer et al., 1996, Perry et al., 1997).

Die Rezidivhäufigkeit bei Meningeomen ist hoch. Sie beträgt bei den benignen Varianten nach Totalresektion 11–15%, nach inkompletter Resektion 29%. Meningeome der WHO-Grade II und III zeigen eine deutlich höhere Rezidivrate (Kolles et al., 1995). Interessanterweise findet sich in Rezidiven nicht selten ein höherer Malignitätsgrad als im primären Tumor. Insbesondere bei den WHO I-Tumoren kommt somit der Abschätzung der Rezidivneigung eine große Bedeutung zu. Histopathologische Marker, die mit der Rezidivhäufigkeit korrelieren, sind aber nicht hinreichend bekannt.

Kürzlich wurde ein Prognosefaktor auf molekulargenetischer Ebene beschrieben. Dabei handelt es sich um Verluste genomischer Sequenzen auf dem kurzen Arm des humanen Chromosoms 1, die als „loss of heterozygosity“ (LOH 1p) bezeichnet werden (Bello et al., 1994b). Diese Deletion findet sich signifikant häufiger in WHO II/III-Meningeomen und scheint gut mit der Rezidivhäufigkeit der Tumoren zu korrelieren. Inzwischen wurde diese Beobachtung durch mehrere unabhängige Arbeiten bestätigt (Niedermayer et al., 1996, Ishino et al., 1998, Sulman et al., 1998, Leone et al., 1999, Bello et al.,

2000). Allerdings ist das Zielgen der Deletion bisher nicht identifiziert.

2.2 Bedeutung klinischer Parameter für das Wachstumsverhalten von Meningeomen

2.2.1 Alter

Der Häufigkeitsgipfel der Meningeomkrankung liegt in der sechsten und siebten Lebensdekade. Aber auch im höheren Lebensalter, bei jüngeren Menschen und bei Kindern können Meningeome vorkommen (Louis et al., 2000). Meningeome im jüngeren Lebensalter werden häufig prognostisch ungünstiger beurteilt, da eine Reihe von Untersuchungen eine höhere Inzidenz maligner Tumorvarianten und eine höhere Rezidivrate in dieser Altersklasse fanden (Crouse und Berg 1972, Deen et al., 1982, Baumgartner und Sorensen 1996). Es existieren jedoch auch Studien, die diese Ergebnisse nicht bestätigen. Germano et al. (1994) fanden keine erhöhte Prävalenz maligner Meningeome in den zwei ersten Lebensdekaden. Diese Diskrepanz zu anderen Untersuchern wird von den Autoren auf diagnostische Schwierigkeiten aufgrund fehlender einheitlicher histopathologischer Kriterien zurückgeführt. Die erhöhte Rezidivrate kindlicher Meningeome erklärt sich möglicherweise dadurch, dass Rezidive häufig mit langer Latenz auftreten, so dass ältere Patienten ein Rezidiv nicht mehr erleben (Adegbite et al., 1983, Mirimanoff et al., 1985).

2.2.2 Geschlecht

Seit langem sind für Meningeome auffallende geschlechtsspezifische Unterschiede in Häufigkeit und Malignitätsgrad bekannt. Frauen erkranken deutlich häufiger als Männer im Verhältnis 2: 1 (Louis et al., 2000), bei spinalen Meningeomen sogar 20:1 (Lapresele et al., 1952). Beim weiblichen Geschlecht kommen zu einem hohen Prozentsatz benigne Tumoren vor, während bei Männern der Anteil atypischer und anaplastischer Meningeome wesentlich höher ist. Bei den WHO I-Tumoren, die ca. 90% aller Meningeome ausmachen, findet sich ein Verhältnis Frauen: Männer von 2: 1 (Louis et

al., 2000), bei atypischen und malignen Varianten beträgt das Verhältnis dagegen nahezu 1:1 (Louis et al., 2000, Antinheimo et al., 2000). Die deutlich erhöhte Prävalenz der benignen Tumorentität bei Frauen läßt eine pathogenetisch wichtige Rolle weiblicher Geschlechtshormone für die Tumorigenese von Meningeomen vermuten (Schrell et al., 1990, Louis et al., 2000). Unterstützt wird diese Hypothese durch ein schon vor Jahrzehnten in einigen Fällen beobachtetes Größenwachstum von Meningeomen während einer Gravidität oder der Lutealphase des Menstruationszyklus (Bickerstaff et al., 1958). Auch eine Komorbidität mit hormonabhängigen gynäkologischen Neoplasien (Schoenberg et al., 1975, Jacobs et al., 1987, Helseth et al., 1989) weist in diese Richtung. Als Erklärung für die geschlechtsspezifischen Unterschiede bieten sich der wesentlich höhere Progesteronspiegel und die stärkere Expression von Progesteronrezeptoren bei Frauen an. Während Östrogenrezeptoren in Meningeomen nicht oder nur zu einem niedrigen Prozentsatz nachgewiesen werden konnten (Tilzer et al., 1982, Schrell et al., 1990, Perrot-Applanat et al., 1992), findet sich Progesteronrezeptorexpression in 80% der weiblichen Meningeome, dagegen nur in 40% der männlichen (Carrol et al., 1993, Hsu et al., 1997). Interessant ist, daß eine starke PgR-Expression nur in benignen Meningeomen zu finden ist, in malignen Tumorvarianten dagegen eine reduzierte bis fehlende Expression vorliegt (Perrot-Applanat et al., 1992, Schlegel et al., 1993, Hsu et al., 1997, Perry et al., 2000). Diese inverse Korrelation von PgR-Expression und Tumorgrad spricht gegen eine Involvierung des Progesterons in die Tumorprogression. Eindeutig geklärt ist der Einfluß der Sexualhormone und ihrer Rezeptoren und damit ihre prognostische Relevanz für die Tumorentstehung und -progression aber bisher nicht.

2.2.3 Lokalisation und Tumorgroße

Der prädiktive Wert von Tumorlokalisation und Tumorgroße wird unterschiedlich beurteilt. Der größte Teil aller zerebralen Meningeome ist im Bereich der lateralen Konvexitäten und der Falx lokalisiert, aber auch im Bereich der olfaktorischen Rinne, des Keilbeinflügels, der Sellaregion, des Nervus opticus, des Tentorium cerebelli, der hinteren Schädelgrube und der Ventrikelumgebung kommen Meningeome vor (Louis et al., 2000). Prognostisch ungünstige atypische oder anaplastische Tumoren finden sich bevorzugt im Bereich der häufigsten Meningeomlokalisationen Konvexität und Falx

(Maier et al., 1992, Louis et al., 2000). Eine signifikante Korrelation zwischen Lokalisation und Wachstumsverhalten wurde von Ketter et al. (2001) festgestellt, dagegen konnten andere Autoren (Mantle et al., 1999) diesen Zusammenhang nicht bestätigen.

Auch die Evaluierung des prognostischen Werts der Tumorgroße zum Zeitpunkt der Operation führte zu diskrepanten Ergebnissen. Maier et al. (1992) fanden, dass Tumoren mit einer durchschnittlichen Größe von 5cm sich als bösartiger erwiesen als kleinere Tumoren. Keine signifikante Korrelation zwischen Tumorgroße und klinisch malignem Verhalten konnte von Mantle et al. (1999) detektiert werden.

2.2.4 Infiltration und peritumorales Ödem

Meningeome sind meist durch ein lokal verdrängendes Wachstumsmuster charakterisiert. Ein kleiner Teil der Tumoren zeigt jedoch invasives Wachstum mit Infiltration von umgebendem Hirn- und Knochengewebe. Diese Tumoren rezidivieren häufiger und sind mit ungünstiger Prognose verbunden (Mantle et al., 1999, Louis et al., 2000). Bei diesen aggressiv wachsenden Tumorvarianten handelt es sich meist um atypische oder anaplastische Meningeome, aber auch histopathologisch benigne können ein derartiges Wachstumsverhalten aufweisen. Die erhöhte Tendenz zu invasivem Wachstum mit ansteigendem Malignitätsgrad konnte auch in in-vitro-Studien nachgewiesen werden (De Ridder et al., 1992).

60% aller Meningeome weisen ein peritumorales Ödem auf (Bradac et al., 1986), das präoperativ neuroradiologisch zu diagnostizieren ist. Das Ausmaß dieses Ödems korreliert nicht mit Tumorgroße und Malignitätsgrad, hat sich jedoch als signifikanter prädiktiver Faktor für die Rezidivrate erwiesen (Yoshioka et al., 1998, Mantle et al., 1999). Diskutiert werden verschiedene Mechanismen, die an der Pathogenese des peritumoralen Ödems beteiligt sein könnten. Eine gute Korrelation scheint zwischen VEGF-Expression im Tumorgewebe und der Ausprägung des Ödems vorzuliegen (Bitzer et al., 1998). Yamasaki et al. (2000) konnten in rezidivierenden Meningeomen eine signifikant erhöhte VEGF-Expression nachweisen.

2.2.5 Ätiologie

Meningeome kommen im Rahmen einer Neurofibromatose Typ 2 (NF2), wesentlich häufiger aber sporadisch ohne gesicherte Ätiologie vor. Daneben gibt es eine ätiologische Untergruppe, die als Folgeerscheinung einer Jahre zurückliegenden low-dose-Bestrahlung bei Tinea capitis (Ron et al., 1988, Sadetzki et al., 2002) oder einer Hochdosisbestrahlung bei primären oder metastatischen malignen Hirntumoren (Mack et al., 1993) auftritt. Die Latenzzeit bis zur Meningeomentwicklung ist abhängig von der applizierten Dosis, sie liegt bei durchschnittlich 35 Jahren bei Bestrahlung mit niedriger Dosis, bei Hochdosisbestrahlung wird eine Latenzzeit von durchschnittlich 20 Jahren berichtet (Harrison et al., 1991).

Diese strahleninduzierten Meningeome werden prognostisch eher ungünstig beurteilt. Für diese Einschätzung spricht der größere Prozentsatz atypischer Tumorvarianten in diesem Kollektiv als unter sporadischen Meningeomen, das häufige Auftreten multipler Tumoren und eine signifikant erhöhte Rezidivrate (Harrison et al., 1991, Soffer et al., 1983, Rubinstein et al., 1994, Sadetzki et al., 2002).

2.2.6 Radikalität der Resektion

Als wichtigster klinischer Prognosefaktor gilt seit langem die Vollständigkeit der Resektion des Meningeoms. Bereits 1957 konnten Simpson et al. nachweisen, daß die Rezidivhäufigkeit eng mit dem Ausmaß der primären Resektion korreliert (Simpson et al., 1957). Der Autor teilte die Radikalität der Resektion in fünf Grade ein, wobei Simpson Grad I einer kompletten Resektion der Dura und abnormal veränderten Knochens entspricht. Die Grade Simpson II-IV stehen für quantitativ inkomplette Prozeduren, Simpson Grad V lediglich für eine Dekompression. Auch neuere Untersuchungen bestätigen die Wertigkeit der kompletten Resektion: Sie erwies sich als aussagekräftigster prädiktiver Faktor für die Rezidivrate (Mirimanoff et al., 1985, Mantle et al., 1999). Allerdings fanden bereits Simpson et al. (1957) trotz makroskopisch kompletter Resektion noch eine Rezidivrate von 9%, neuere Studien mussten diese Rezidivrate sogar auf 11-15% korrigieren (Chan und Thompson et al., 1984, Jääskeläinen 1986), sodass die Suche nach weiteren Prognosefaktoren aus klinischer Sicht notwendig erscheint.

2.3 WHO-Klassifikation meningealer Tumoren

2.3.1 Histopathologische Kriterien

Bis 1993 unterschied die WHO nur zwei Typen von Meningeomen: Zum einen die große Gruppe der benignen Tumoren mit ihren zahlreichen Subtypen wie meningotheliomatösen, fibroblastischen, transitionellen, psammomatösen und weiteren histologischen Varianten, zum anderen die kleine Gruppe der malignen Tumoren (Louis et al., 1989). Klinische Erfahrung zeigte jedoch, dass eine weitere Gruppe von Meningeomen existiert, die sich aggressiver verhält als benigne Tumoren, aber weniger aggressiv als maligne Meningeome (Scheithauer et al., 1990). In die revidierte Fassung der WHO-Klassifikation der Hirntumoren aus dem Jahre 1993 wurde deshalb das atypische Meningeom aufgenommen und als WHO-Grad II zwischen den benignen WHO I-Tumoren und den malignen WHO III-Tumoren klassifiziert (Louis et al., 1993). Als histopathologische Kriterien des atypischen Meningeoms wurden häufige Mitosen, erhöhte Zelldichte, hohe Kern-Zytoplasma-Relation, strukturarmes Wachstum, prominente Nukleolen und nekrotische Anteile vorgeschlagen (Louis et al., 1993). Als Problem erwies sich die Tatsache, dass sich die angegebenen Diagnosekriterien nur in quantitativer Hinsicht von den Diagnosekriterien für WHO III-Meningeome unterscheiden: Anaplastische Tumoren weisen „offensichtliche Zeichen der Malignität“ auf, die „weit über die Abnormalitäten atypischer Meningeome“ hinausreichen. So blieb das Grading aufgrund histopathologischer Marker trotz der Einführung des WHO II-Typs in manchen Fällen schwierig (Niedermayer et al., 1996, Perry et al., 1997). Ein weiteres Problem blieb trotz der Einführung des WHO-Grad II Meningeoms ungelöst: Für die 11-15% WHO I-Meningeome, die trotz benignem Phänotyp rezidivieren, konnten bis heute keine sicheren histopathologischen Marker etabliert werden, die mit der Rezidivrate korrelieren.

Da folglich der prädiktive Wert histopathologischer Kriterien für das Wachstumsverhalten von Meningeomen umstritten ist, wurden zur besseren Differenzierung zusätzlich proliferationskinetische Untersuchungsmethoden vorgeschlagen (Louis et al., 1993, Kolles et al., 1995, Niedermayer et al., 1996).

2.3.2 *Proliferationskinetische Kriterien*

Die Proliferationstendenz eines Gewebes spiegelt sich in der Anzahl der sichtbaren Mitosen wieder. Für Meningeome beschreibt die WHO-Working-Group signifikante Unterschiede der Mitose-Indizes der verschiedenen WHO-Grade. WHO-Grad I Tumoren sind durch < 4 Mitosen/ 10 HPF (high-power fields) definiert, ≥ 4 Mitosen/ 10 HPF entspricht dem WHO-Grad II, ≥ 20 Mitosen/ 10 HPF dem WHO-Grad III (Louis et al., 2000). Allerdings erlaubt auch der Mitose-Index keine sichere prognostische Aussage hinsichtlich des Wachstumsverhaltens von Meningeomen.

Als weitere Methode zur Erfassung des proliferativen Potentials von Meningeomen kommt die Beziehung zwischen dem Färbeindex nach in-situ-bromodeoxyuridin (BUdR)-Inkorporation und der Tumorverdopplungszeit in Frage (Cho et al., 1986). Durch Einbau des markierten Uridins in die DNA in der S-Phase des Zellzyklus zeigen stark proliferierende Meningeome eine hohe BUdR-Aktivität, während langsam wachsende eine niedrige Aktivität aufweisen (Lee et al., 1990, Shibuya et al., 1992, Younis et al., 1995).

Die Ki-67 (MIB-1)-Reaktion detektiert ein nukleäres Protein, das einen Marker für die Proliferationsfraktion von Tumoren darstellt und sich deshalb als Indikator für das biologische Verhalten eines Tumors eignet (Gerdes et al., 1983). Auch in Meningeomen zeigt sich diese Methode zur Evaluierung des proliferativen Potentials erfolgreich (Roggendorf et al., 1987, Ohta et al., 1994). Kolles et al. (1995) gelang es mit Hilfe der Ki-67-Immunhistochemie, die drei WHO-Grade meningealer Tumoren zu definieren. Da der kernflächenbezogene Ki-67-Färbeindex allerdings innerhalb der einzelnen WHO-Grade eine große Streubreite zeigt, wird er von den Autoren nur in Kombination mit anderen Markern zum Grading von Meningeomen empfohlen.

Auch Untersuchungen des DNA-Gehalts und der S-Phase-Fraktion der Tumorzellen sind in der Lage, eine Aussage über das Proliferationsverhalten von Meningeomen zu machen (Grunewald et al., 1998, Lahiri et al., 2001). Perry et al. (1998), messen der Bestimmung des DNA-Gehalts zur prognostischen Einschätzung im Vergleich zu anderen proliferationskinetischen Methoden geringere Bedeutung bei.

Zusammenfassend kommt proliferationskinetischen Untersuchungen ein gewisser, teilweise umstrittener prädiktiver Wert zu, allerdings nur in Kombination mit anderen Markern.

Infolgedessen wird in der neuesten Fassung der WHO-Klassifikation meningealer

Tumoren aus dem Jahre 2000 im Vergleich zu den vorherigen Versionen der Prognoseabschätzung aufgrund zusätzlicher zyto- und molekulargenetischer Kriterien besondere Bedeutung zugemessen (Louis et al., 2000).

2.4 Genetische Veränderungen bei Meningeomen

Gene können aktiv an der Entwicklung und / oder Progression eines Tumors beteiligt sein. Derartige Gene wurden zuerst in Retroviren gefunden und als Onkogene bezeichnet. Sie entstehen durch Mutation oder Fehlregulation aus normalen Genen, sogenannten Protoonkogenen. Ein Beispiel sind die Gene der *RAS*-Familie, die in zahlreichen humanen Tumoren durch „gain-of-function“-Mutationen zum Onkogen aktiviert werden.

Bei anderen in die Tumorigenese involvierten Genen führt nicht Aktivierung, sondern Inaktivierung zu unkontrolliertem Zellwachstum. Sie werden als Tumorsuppressorgene oder Antionkogene bezeichnet. Ihre physiologische Funktion liegt in der Regulierung von Zellwachstum und Differenzierung, dadurch spielen sie eine wichtige Rolle in der Unterdrückung unkontrollierter Zellproliferation. Die Inaktivierung dieser Gene kann durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden. Zumeist ist der Verlust der Genfunktion Folge des Verlusts genomischer Sequenzen („loss- of- function“-Mutation).

Derartige Deletionen lassen sich zytogenetisch oder aber molekulargenetisch mit Hilfe von polymorphen DNA-Markern nachweisen. Bei Verlust eines Allels eines polymorphen Locus findet sich „loss-of-heterozygosity“ (LOH) für den betreffenden Genort. Da die Funktion eines Gens aber in der Regel erst dann verloren geht, wenn beide Allele inaktiviert sind, kann der Verlust der Heterozygotie nicht alleine für die tumorigene Wirkung verantwortlich sein. Entsprechend Knudsons „two-hit“-Modell (Knudson, 1971) muß auch das verbleibende Allel eines Tumorsuppressorgens in seiner Funktion geschädigt sein. Dies kann ein submikroskopisches Ereignis sein, dessen Entdeckung detaillierteren molekulargenetischen Untersuchungsmethoden vorbehalten bleibt. Prototypen für Tumorsuppressorgene sind z. B. das Retinoblastom-Gen auf Chromosom 13q14.2, das p53-Gen auf Chromosom 17p13 und das Wilm`s-Tumor-Gen auf Chromosom 11p13.

Wenn bei einer Tumorart überzufällig häufig Deletionen einer bestimmten

chromosomalen Region gefunden werden, besteht der dringende Verdacht, daß an diesem Genlocus ein oder mehrere Tumorsuppressorgene lokalisiert sind (Übersicht bei Knudson, 1993).

2.4.1 Die Rolle des Chromosoms 22

Hinweise auf einen genetischen Faktor in Ätiologie und Pathogenese von Meningeomen ergaben sich frühzeitig. So ist seit langem bekannt, daß bei der seltenen autosomal-dominanten Erbkrankheit Neurofibromatose Typ 2 (NF2) neben den charakteristischen bilateralen Schwannomen auch häufig (bis zu 50%) Meningeome auftreten (Martuza und Eldridge, 1988). Auch über eine familiäre Disposition für Meningeome sowie über Patienten mit multiplen Meningeomen wird berichtet (Battersby et al., 1986, Domenicucci et al., 1989). Beides läßt auf eine genetische Disposition schließen und hat zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen intensiviert.

Meningeome gehören inzwischen zu den auf chromosomaler Ebene am besten untersuchten soliden Tumoren des Menschen. Es zeigte sich, daß nicht nur bei den erblichen Tumorvarianten, sondern auch bei sporadischen Meningeomen gehäuft genetische Veränderungen nachweisbar sind. Bereits 1967 wurde ein überzufällig häufiges Fehlen eines G-Chromosoms in Meningeomzellkulturen entdeckt (Zang und Singer, 1967). Damit war das Meningeom der erste solide Tumor, der durch eine typische chromosomale Veränderung charakterisiert werden konnte. Mit der weiteren Entwicklung der Bandingtechniken konnte gezeigt werden, daß es sich dabei um den teilweisen oder häufiger vollständigen Verlust eines Chromosoms 22 handelt (Mark et al., 1972, Zankl und Zang, 1972). Monosomie 22 oder Teildeletion eines Chromosoms 22 als häufigste genetische Anomalie bei Meningeomen wurde in den folgenden Jahren in einer Vielzahl von zytogenetischen Untersuchungen bestätigt (Zankl und Zang, 1980, Al Saadi et al., 1987).

Molekulargenetische Untersuchungen mit polymorphen DNA-Markern entdeckten in Übereinstimmung mit den vorhergehenden zytogenetischen Studien Deletionen des langen Arms von Chromosom 22 in mehr als 60% aller Meningeome (Seizinger et al., 1987a, Meese et al., 1987, Dumanski et al., 1990). Dabei handelt es sich um Monosomie 22 oder um LOH für eine unterschiedliche Anzahl von Allelen. Immer genaueren Untersuchungen gelang es, die Zielregion der Deletion weiter einzugrenzen

(Rouleau et al., 1990). Schließlich konnte in NF2-assoziierten Meningeomen das Kandidatengen für NF2 auf Chromosom 22q12 identifiziert werden (Rouleau et al., 1993, Trofatter et al., 1993). Als Ziel der inaktivierenden Mutation bei Patienten mit Keimbahnmutation des *NF2*-Gens wurde das *NF2*-kodierte Protein Merlin (oder Schwannomin) nachgewiesen (Trofatter et al., 1993, Gutmann et al., 1997).

Wenig später konnte gezeigt werden, daß auch in der Mehrzahl der sporadischen Meningeome mit Verlusten auf Chromosom 22 *NF2* das Zielgen zu sein scheint (Ruttledge et al., 1994a), zumal auch inaktivierende Mutationen oder Deletionen des zweiten *NF2*-Allels entsprechend Knudsons „two-hit“-Modell (Knudson et al., 1971) nachgewiesen werden konnten (Ruttledge et al., 1994b, Lekan Deprez et al., 1994, De Vitis et al., 1996).

Durch Transfer eines Wildtyp-*NF2*-Gens in *NF2*-negative wie auch *NF2*-positive Meningeom-Zellkulturen konnte eine Überproduktion des Merlin-Proteins und damit eine signifikante Hemmung der Zellproliferation erzielt werden (Ikeda et al., 1999). Auch in-vivo (Ratten) konnte gezeigt werden, dass eine Merlin-Überexpression Tumorstwachstum hemmen kann (Sherman et al., 1997). Diese Befunde stützen die Hypothese, daß das *NF2*-Gen als Tumorsuppressorgen in die Entwicklung von Meningeomen involviert ist.

Allerdings ließ sich in einem Teil der sporadischen Meningeome mit Verlusten auf Chromosom 22 keine Beteiligung der *NF2*-Region finden, dagegen aber ein LOH-Muster, das nahelegt, daß möglicherweise auch ein oder mehrere andere Tumorsuppressorgene distal des *NF2*-Locus in die Tumorigenese von Meningeomen involviert sind (Ruttledge et al., 1994, Akagi et al., 1995). Bisher konnten einige Kandidatengene wie z.B. *BAM22* (Peyrard et al., 1994) und *LARGE* (Peyrard et al., 1999) identifiziert werden, deren Bedeutung in der Meningeomentwicklung aber noch nicht gesichert ist.

Verlust genetischer Information auf Chromosom 22 wurde auch bei anderen humanen Tumoren wie Phäochromozytomen (Tanaka et al., 1992), Ependymomen (James et al., 1990), malignen Mesotheliomen (Fleijter et al., 1989), Kolonkarzinomen (Miyaki et al., 1990), wie auch bei sporadischen und NF2-assoziierten Schwannomen (Seizinger et al., 1987b, Wolff et al., 1992) entdeckt. Tumorsuppressorgene, die zur Entwicklung von Meningeomen prädisponieren, könnten somit auch bei der Entwicklung anderer Tumoren eine Rolle spielen.

Neben dem Genverlust auf Chromosom 22 finden sich oft eine Vielzahl weiterer

chromosomaler Alterationen bei Meningeomen. Allerdings sind Chromosom 22 Veränderungen in allen zytogenetischen und molekulargenetischen Studien signifikant häufiger als Veränderungen auf anderen Chromosomen (Zankl und Zang 1980, Al Saadi et al., 1987, Seizinger et al., 1987a, Lekanne Deprez et al., 1995, Weber et al., 1997). Von diesen Chromosom 22-Veränderungen sind benigne Tumorvarianten ebenso betroffen wie maligne, eine Korrelation mit Tumorprogression ist nicht erkennbar. Wenn Monosomie 22 als einzige chromosomale Veränderung auftritt, handelt es sich in der Regel um WHO I-Meningeome. Häufigkeit und fehlende Korrelation zum Malignitätsgrad lassen die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen auf Chromosom 22 als fundamentales frühes Ereignis (primäre Anomalie) in der Tumorentwicklung von Meningeomen erscheinen, dem - entsprechend dem Modell der Mehrschrittkanzerogenese - im Laufe des Tumorwachstums mit zunehmender Instabilität des Genoms weitere sekundäre Anomalien folgen.

Für die Gruppe von Meningeomen ohne nachweisbare Veränderungen auf Chromosom 22 muß ein anderer Mechanismus der Tumorentstehung verantwortlich gemacht werden. Ein Hinweis darauf, daß mehrere molekulargenetische Wege existieren, könnte auch die signifikante Korrelation zwischen histologischen Untergruppen von Meningeomen und dem Verlust genetischer Information auf Chromosom 22 sein. Fibroblastische und transitionelle Varianten sind in 70-90% mit *NF2*-Verlust assoziiert, meningotheiomatöse dagegen nur in ca. 23-36% (Ruttledge et al., 1994, Wellenreuther et al., 1995, Evans et al., 2001).

Kros et al. (2001) weisen zusätzlich zu der beschriebenen Korrelation zwischen *NF2*-Status und Histomorphologie eine Korrelation zwischen *NF2*-Status und Tumorlokalisation nach: Während *NF2*-positive Tumorvarianten bevorzugt im Bereich der vorderen Schädelbasis lokalisiert sind, finden sich *NF2*-negative eher im Bereich von Konvexität und Falx.

2.4.2 Chromosomale Veränderungen außerhalb Chromosom 22

Neben Monosomie 22 oder Teilverlust eines Chromosoms 22 als häufigster Veränderung wurden bereits in den frühen zytogenetischen Meningeomstudien eine Reihe weiterer chromosomaler Veränderungen in geringerer Häufigkeit entdeckt (Mark et al., 1972, Zankl und Zang, 1980). Zytogenetische Untersuchungen an größeren Tumorzahlen ergaben numerische Abweichungen an verschiedenen Chromosomen, z.B. Chromosom 14 und 17, und insbesondere eine variable Zahl struktureller Veränderungen an Chromosom 1, 7, 10, 14, und 19 (Maltby et al., 1988, Al Saadi et al., 1987, Rey et al., 1988a). Auch über den Verlust des Y-Chromosoms wird berichtet (Maltby et al., 1988, Logan et al., 1990). Unter den strukturellen Veränderungen finden sich verschiedenartigste Rearrangements wie dizentrische Chromosomen, Translokationen, Ring- und Markerchromosomen (Rey et al., 1988b). Ein eindeutiges Muster an zusätzlichen Veränderungen zur Monosomie 22 läßt sich aus diesen Untersuchungen zunächst nicht erkennen. LOH-Studien mit spezifischen DNA-Markern für alle Chromosomen bestätigen diese Befunde: Neben der häufigsten Anomalie von Chromosom 22 finden sich Deletionen auf mehreren anderen Chromosomen (Seizinger et al., 1987). Auffallend ist, daß Tumoren ohne Chromosom 22-Veränderungen meist auch keine Veränderungen an anderen Chromosomen aufweisen. Dies stützt die Hypothese, daß chromosomale Veränderungen anderer Chromosomen als sekundäre Anomalien im Gefolge primärer Veränderungen auf Chromosom 22 auftreten.

Untersuchungen, die eine annähernd gleich große Anzahl von Tumoren der drei verschiedenen WHO-Grade einbeziehen, zeigen eine eindeutige Korrelation zusätzlicher chromosomaler Veränderungen außerhalb Chromosom 22 mit ansteigendem WHO-Grad (Rempel et al., 1993, Simon et al., 1995, Weber et al., 1997). Daraus ergibt sich ein klarer Zusammenhang zwischen zusätzlichen Chromosomenveränderungen und zunehmender Aggressivität und Malignität. Gezielte Studien an atypischen und anaplastischen Tumorvarianten (Lindblom et al., 1994, Perry et al., 1996) lassen ebenfalls darauf schließen, daß zusätzliche Anomalien einen wichtigen Schritt in der Tumorprogression darstellen.

Versuche, bei Meningeomen die Zielregion der genomischen Deletionen auf anderen Chromosomen näher einzugrenzen, haben bisher nicht zur eindeutigen Identifizierung von weiteren Tumorsuppressorgenen außer dem *NF2*-Gen geführt (Menon et al., 1997, Weber et al., 1997, Leone et al., 1999). Büschges et al. (2001) gelang es, einige TSGs

auf Chromosom 18q wie *MADH2*, *MADH4*, *APM-1* und *DCC*, die in die Tumorigenese anderer humaner Tumoren involviert sind (Fearon et al., 1990a, Eppert et al., 1996, Reuter et al., 1998), als Zielgene der progressionsassoziierten genomischen Veränderungen in Meningeomen auszuschliessen. Auf Chromosom 14 konnte im Bereich häufiger Deletionen das für das Zytoskelett-Protein β 2-Spektrin kodierende Gen identifiziert, seine Interaktion mit Merlin nachgewiesen und sein Verlust in Schwannomen und Meningeomen gezeigt werden (Scoles et al., 1998). Kürzlich wurde mit DAL-1 ein weiteres Mitglied der Familie der membran-assoziierten 4.1 Proteine, zu welcher auch Merlin und β 2-Spektrin gehören, auf Chromosom 18p11.3 als mögliches TSG in Meningeomen diskutiert. Neueste Studien berichten über einen DAL-1-Verlust in 30-70% aller Meningeome, obwohl die zytogenetisch detektable Monosomie 18 in benignen Meningeomen ein seltenes Ereignis darstellt (Gutmann et al., 2000, Perry et al., 2000). Perry et al. (2000) finden interessanterweise in nahezu allen analysierten Meningeomen entweder Merlin- oder DAL-1-Verlust oder eine reduzierte Expression beider Proteine.

Als mögliche Erklärung für das komplexe Bild chromosomaler Veränderungen bei aggressiven Meningeomen bietet sich ein „multi-step“-Prozeß an, wie er als Modell für Entwicklung und Progression anderer menschlicher Tumoren, z. B. für kolorektale Tumore (Fearon und Vogelstein, 1990) und Gliome (Collins et al., 1993) bereits beschrieben worden ist.

2.4.3 1p- Deletionen

Sowohl zytogenetische wie molekulargenetische Untersuchungen haben gezeigt, daß bei menschlichen Tumoren neben anderen Chromosomenveränderungen überzufällig häufig strukturelle Rearrangements von Chromosom 1 zu finden sind (Mertens et al., 1997, Mitelman et al., 1997). Davon sind solide Tumoren ebenso betroffen wie Leukämien und myeloproliferative Erkrankungen (Olah et al., 1989). Auch experimentelle Untersuchungen unterstützen die Hypothese einer Beteiligung von Chromosom 1 an unkontrolliertem Zellwachstum. So konnte durch Einbringen eines intakten Chromsoms 1 in eine Zellkultur von Kolonkarzinomzellen (COKFu) die Tumorigenität dieser Zellen unterdrückt werden (Tanaka et al., 1993).

Besonders häufig scheinen genomische Veränderungen des kurzen Arms von

Chromosom 1 in die Tumorigenese humaner Tumoren involviert zu sein. 1p-Deletionen werden als charakteristische Veränderung bei Neuroblastomen beobachtet (Brodeur et al., 1981, Takayama et al., 1992, Martinsson et al., 1995). Unter den Gliomen ist besonders die Untergruppe der Oligodendrogliome zu einem hohen Prozentsatz mit LOH 1p assoziiert (Bello et al., 1994a, Reifenberger et al., 1994). Auch beim malignen Melanom (Finger et al., 1989, Bale et al., 1989, Dracopoli et al., 1989), Leberzellkarzinom (Yeh et al., 1994, Kuroki et al., 1995), Hepatoblastom (Kraus et al., 1996), Mammakarzinom (Bieche et al., 1993) und einer Reihe anderer Tumoren finden sich häufig Veränderungen auf dem kurzen Arm von Chromosom 1. Die häufige Involvierung dieser Region in die Entwicklung verschiedenartiger humaner Tumoren läßt auf das Vorhandensein von Tumorsuppressorgenen schließen.

Versuche, die für die einzelnen Tumoren verdächtige Region näher einzugrenzen oder ein oder mehrere verantwortliche Tumorsuppressorgene zu identifizieren, sind in großer Zahl durchgeführt worden. Beim Neuroblastom konnte gezeigt werden, daß die kleinste Deletion proximal durch den Marker D1S244, distal durch den Marker D1S50 begrenzt wird (Martinsson et al., 1995). Bei kolorektalen Karzinomen, Mammakarzinomen und hepatozellulären Karzinomen scheint auch meist der distale Abschnitt (1p35-36) betroffen zu sein, daneben aber auch eine mehr zentromerwärts gelegene Region. Deletionen bei Oligodendrogliomen umfassen häufig fast den ganzen kurzen Arm des Chromosoms 1, wobei Bruchstellen meist bei 1p13 lokalisiert sind (Bello et al., 1995).

Bei Meningeomen geben eine Reihe von Studien den kurzen Arm von Chromosom 1 als den Chromosomenarm an, der nach Chromosom 22 am häufigsten vom Verlust genomischer Sequenzen betroffen ist. Jimenez-Lara et al. (1992) fanden an einem Panel von 125 Meningeomen aller WHO-Grade als häufigste sekundäre Anomalie LOH 1p.

Die Häufigkeit der 1p-Deletionen in derartigen Tumorgruppen, die in der Regel überwiegend benigne Tumorvarianten und nur wenige maligne enthalten, wird in verschiedenen Untersuchungen zwischen 20% und 35% angegeben (Sulman et al., 1998, Bello et al., 1994 und 2000, Leuraud et al., 2000).

Auffallend größer ist die Frequenz der 1p-Deletionen bei einem Tumorkollektiv der WHO-Grade II und III. Lindblom et al. (1994) entdeckten an einer Gruppe anaplastischer Tumorvarianten Deletionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 in 58%. Eine eindeutige Beziehung der 1p-Deletionen zum WHO-Grad geht auch aus der 50 Meningeome umfassenden Studie von Bello et al. (1994b) hervor: Alle 13 Tumoren

der Studie, bei denen LOH 1p beobachtet wurde, waren histopathologisch den WHO-Graden II oder III zuzuordnen. Auch neueste LOH-Analysen identifizieren 1p-Deletionen in Meningeomen vom WHO-Grad II und III mit wesentlich größerer Häufigkeit als in benignen Tumorvarianten (Weber et al., 1997, Leone et al., 1999, Boström et al., 2001). Eine zytogenetische Studie an 37 Meningeomen (Ishino et al., 1998) bestätigt diese Befunde: Atypische Meningeome zeigten zu 60% 1p-Deletionen, anaplastische zu 85,7%, typische Meningeome nur zu einem geringen Prozentsatz. Die Unterschiede zwischen der WHO I-Tumorgruppe und der Gruppe der WHO II/III-Tumoren waren statistisch hoch signifikant. Diese Korrelation mit malignem Phänotyp läßt darauf schließen, dass 1p-Deletionen bei Meningeomen als progressionsassoziierte Veränderungen auftreten.

Sulman et al. (1998) setzten in einer Untersuchung an 157 Meningeomen 1p-Deletionen mit anderen klinischen und molekularen Charakteristika in Beziehung und fanden nur für 1p-Deletionen eine statistisch signifikante Korrelation mit dem rezidivfreien Intervall: Ca. 40% der Patienten mit LOH 1p waren nach 10 Jahren rezidivfrei, dagegen 60% der Patienten ohne LOH 1p; die Rezidivhäufigkeit der LOH-Gruppe betrug 42%, die der Gruppe ohne LOH 17%.

Die Korrelation mit Tumorprogression und rezidivfreiem Intervall legt nahe, LOH 1p als molekulargenetischen Prognosefaktor in Meningeomen anzusehen. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang WHO I-Tumoren, bei denen LOH 1p auf eine mögliche maligne Progression hindeuten könnte, bevor histopathologische Kriterien der Malignität erkennbar sind.

2.4.4 Kartierungsversuche der 1p-Deletionen

Frequenz der 1p-Deletionen, Progressionsassoziation und Korrelation mit rezidivfreiem Intervall legen den Verdacht nahe, dass im Bereich der Deletionen ein oder mehrere Tumorsuppressorgene lokalisiert sind, die in die Tumorprogression bei Meningeomen involviert sind. Untersuchungen, die primär die Detektion von LOH auf Chromosom 1p, die Häufigkeit dieser Veränderungen und ihre Korrelation zum Malignitätsgrad analysierten, arbeiteten nur mit einer kleinen Anzahl von 1p Loci (Bello et al., 1994b, Lindblom et al., 1994, Simon et al., 1995), so dass eine genaue Lokalisation der Veränderungen aus diesen Studien nicht zu ersehen war. Mit der Bestätigung der 1p-

Deletionen als prädiktiver Faktor für Wachstumsverhalten von Meningeomen gewann eine präzisere Eingrenzung der Zielregion an Bedeutung. Bisherige Kartierungsversuche der 1p-Deletionen erbrachten teils übereinstimmende, teils diskrepante Ergebnisse. Boström et al. (1997) analysierten 19 Loci auf 1p in 63 Meningeomen und fanden eine allen Tumoren gemeinsame Deletionsregion im Bereich 1p34-1pter, telomer des D1S496 Locus gelegen. Sulman et al. (1998) entdeckten mit einer großen Zahl von 1p-Markern eine 1,5 cM umspannende Konsensusregion bei 1p32, die distal von D1S2713, proximal von D1S2134 begrenzt wird. Diese Region umfasst den Genort für die in Beziehung zur T-Zell-Leukämie stehenden Gene *TALI* und *SIL*, den Locus für die Tyrosinkinase JAK1 sowie für p18 (*CDKN2C*). Leone et al. (1999) erstellten mit 15 1p-Markern bei 81 Meningeomen eine Deletionskarte, die drei verschiedene verdächtige Regionen definiert: eine kritische Region betrifft 1p36-p35, eine weitere 1p35-p32, eine dritte Region 1p22-p13. Mit einer größeren Zahl von 1p-Markern konnten an dieser auf 100 Exemplare erweiterten Tumorgruppe weitere Loci untersucht werden und damit die kritischen Regionen auf zwei Hauptzielregionen eingeschränkt werden: 1p36 und 1p34-p32 (Bello et al., 2000).

2.4.5 Identifizierung möglicher Zielgene der 1p-Deletionen

Um die Zielregion der 1p-Deletionen einzugrenzen, sind auch Expressionsanalysen von bereits bekannten Genen, deren Lokalisation auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 gesichert ist, durchgeführt worden. Es ist seit langem bekannt, dass in meningealem Gewebe wie auch in meningealen Tumoren das Isoenzym der gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase (Leber/Knochen/Nierentyp) exprimiert wird (Goldstein et al., 1980). Dieses Enzym fehlt bei der infantilen Hypophosphatasie, das kodierende Strukturgen konnte auf 1p36.1-34 lokalisiert werden (Greenberg et al., 1990). Bei Meningeomen wurde schon frühzeitig im Zusammenhang mit Tumorprogression ein Aktivitätsverlust der zytoplasmatischen alkalischen Phosphatase beobachtet (Fischer et al., 1970). Niedermayer et al. (1997) konnten eine signifikante Korrelation zwischen ALPL-Aktivitätsverlust und 1p-Deletionen bei Meningeomen nachweisen und damit ALPL-Expression als leicht zu untersuchenden Marker auf Proteinebene für eine 1p-Deletion etablieren. Die Autoren schließen aus dieser Korrelation, dass das *ALPL*-Gen selbst oder eng benachbarte Gene in Meningeomen als Tumorsuppressorgene agieren

könnten. Weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe (Müller et al., 1999) bestätigten die enge Verknüpfung von ALPL-Expression und dem Verlust genomischen Materials auf 1p und evaluierten durch Vergleich mit klinischen Parametern die diagnostische und prognostische Bedeutung von 1p-Deletionen in Meningeomen.

Santarius et al. (2000) untersuchten die Rolle des *p18*-Gens (*CDKN2C*), eines neuen Mitglieds der INK4-Familie der CDK-Inhibitoren, dessen Genort kürzlich auf 1p32 lokalisiert werden konnte. Trotz hoher LOH-Frequenz mit 1p32-Mikrosatellitenmarkern wurde immunhistochemisch kein Expressionsverlust des p18-Proteins gefunden. Genaue molekulare Analysen entdeckten eine stille Mutation, aber keine „missense“-Mutation oder inaktivierende Methylierung. Auch neueste Untersuchungen an einer Gruppe von 19 bzw. 39 Meningeomen mit LOH 1p konnten nur in einem einzigen Fall eine somatische Mutation des *p18*-Gens entdecken (Leuraud et al., 2000, Boström et al., 2001). Diese Befunde sprechen gegen eine Involvierung des *p18*-Gens als Tumorsuppressorgen in die Meningeomentwicklung.

Eine mögliche Tumorsuppressorfunktion in Meningeomen wurde auch für das *p73*-Gen vermutet, das auf Chromosom 1p36.33 lokalisiert werden konnte, eine chromosomale Region, die in humanen Neoplasien häufig alteriert ist. Interessanterweise kodiert das *p73*-Gen für ein Protein, das dem Tumorsuppressor p53 strukturell und funktionell ähnlich ist (Jost et al., 1997, Kaghad et al., 1997). Gezielte Mutationsanalysen (Lomas et al., 2001, Alonso et al., 2001) dieses Gens in Meningeomen mit nachgewiesener 1p-Deletion konnten jeweils nur in einem Tumor eine Mutation detektieren. Diese Resultate machen eine Involvierung von p73 als Tumorsuppressor in Meningeomen eher unwahrscheinlich.

Eine eindeutige Identifizierung eines oder mehrerer Zielgene der 1p-Deletion bei Meningeomen ist somit bisher nicht gelungen.

3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Klinische, histopathologische und proliferationskinetische Kriterien haben sich als unzureichende prädiktive Faktoren für das Wachstumsverhalten von Meningeomen erwiesen. Insbesondere lassen sich damit Malignitätsgrad und Rezidivhäufigkeit nicht sicher beurteilen. Deshalb werden zunehmend Prognosefaktoren auf molekulargenetischer Ebene diskutiert. Der Verlust genomischer Sequenzen auf dem kurzen Arm des humanen Chromosoms 1 scheint hierbei von besonderer Bedeutung zu sein. Mehrere unabhängige Arbeiten bestätigen eine Korrelation zwischen 1p-Deletionen und Malignitätsgrad meningealer Tumoren, ein Zielgen der Deletion ist aber bisher nicht identifiziert.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher versucht werden,

1. eine Expressionskarte Chromosom 1p-spezifischer Transkripte in einem Meningeomkollektiv von 25 Tumoren der WHO-Grade I bis III zu erstellen und diese mit dem Transkriptionsstatus meningealen Normalgewebes zu vergleichen,
2. die Korrelation des Expressionsmusters auf 1p mit klinischen Parametern, insbesondere aggressivem Wachstum, Rezidivneigung und WHO-Grad, zu überprüfen,
3. charakteristische Expressionsdefizite auf RNA-Ebene auf Proteinebene mittels Westernblot zu überprüfen, um die Korrelation zwischen Transkription und Proteinexpression zu sichern,
4. die DNA-Ebene mittels Mikrosatellitenanalyse auf LOH zu überprüfen, um die Korrelation von Transkriptionsdefiziten mit genomischen Veränderungen zu analysieren und den Zielbereich der 1p-Deletion näher einzugrenzen,
5. immunhistochemisch ein unabhängiges, größeres Tumorkollektiv (n = 58) auf einen Verlust der ALPL-Aktivität zu überprüfen. Die Resultate sollten mit den eigenen Ergebnissen auf molekulargenetischer Ebene und dem in der Literatur beschriebenen progressionsassoziierten Verlust der ALPL-Aktivität in Korrelation gesetzt werden, um einen möglichen molekulargenetischen Prognosefaktor durch eine einfache praktische Methode der Routinediagnostik zugänglich zu machen.

4 MATERIAL UND METHODIK

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien und Geräte

Alle in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Chemikalien wurden – sofern nicht gesondert vermerkt – von der Firma Roth, Karlsruhe, BRD, oder von der Firma Sigma, Deisenhofen, BRD, bezogen.

Die Taq-DNA-Polymerase, das RNeasy RNA Isolationskit, das RNase-Free DNase Set und der QIAamp Tissue Kit zur Extraktion der DNA stammten von Qiagen, Hilden, BRD.

Hexanukleotide, Moloney Murine Leukämia Virus (M- MLV) Reverse Transkriptase, 2'- deoxynukleotid 5'- triphosphat Set (dNTPs) und der DNA-Größenmarker (1kb DNA-Leiter) wurden von Boehringer, Mannheim, BRD, bezogen.

Als Proteinmarker wurden der "Protein Molecular Weight Marker" von New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA, oder "Kaleidoscope Prestained Standards" von Biorad, Hercules, CA, USA, verwendet.

Alle Chemikalien für den Protein-Assay nach Bradford wurden von Biorad, Hercules, CA, USA, bezogen.

Die Röntgenfilme BioMax light (hochsensibel) und X-OMAT MA (unsensibel) stammten von Eastman Kodak, Rochester, USA.

Die Polyvinyliden-difluorid (PVDF) Membranen (Immobilion) für die Western-Blot Analysen wurden von Millipore, Bedford, MA, USA, bezogen.

Die ECL Chemolumineszenzreagentien zur Detektion der Immunreaktion für die

Western-Blot-Analysen stammten von Amersham, Braunschweig, BRD.

Das Vectorstain ABC-Elite-Peroxidase-KIT zur Durchführung der Immunhistochemie wurde von Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, bezogen.

In der vorliegenden Arbeit kamen folgende Geräte zum Einsatz:

PCR wurde in einem PTC-100 Thermocycler von MJ Research Inc., Watertown, Mass., USA und einem PCR-Sprint von Hybaid Ashford, Middlesex, durchgeführt.

Sämtliche eingesetzte Gelelektrophoresekammern sowie die Blotkammer stammten von Biorad, Hercules, CA, USA, die Spannungsquellen von Pharmacia LKB, Freiburg, BRD.

Die Gewebeschnitte wurden mit dem Schlittenmikrotom Leica SM 2000R hergestellt.

4.1.2 Gewebe-und Blutproben

Die molekulargenetisch untersuchten Tumor- und zugehörigen Blutproben stammten aus der Tumorbank der Abteilung für Neuropathologie der Philipps-Universität Marburg. Die Gewebeproben wurden bei der Tumorresektion noch im Operationssaal in flüssigen Stickstoff aufgenommen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Ebenso wurden die Blutproben (EDTA- oder Zitratblut) nach der Entnahme bei -80°C aufbewahrt. Der histologische Subtyp und WHO-Grad der Tumoren wurden an Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbten Gefrierschnitten durch einen erfahrenen Neuropathologen bestimmt. Als meningeales Normalgewebe dienten Pacchionische Granulationen eines Verstorbenen ohne bekannte Erkrankung des zentralen Nervensystems. Das molekulargenetisch untersuchte Tumorkollektiv bestand aus 25 Meningeomen und setzte sich wie folgt zusammen:

WHO-Grad	Anzahl der Tumoren	Histologischer Subtyp
I	18	meningotheliomatös 7 fibroblastisch 6 transitionell 5
II	4	atypisch
III	3	anaplastisch

Tabelle 4-1 Übersicht des mit molekulargenetischen Techniken untersuchten Tumorkollektiv.

Das immunhistochemisch analysierte Tumorkollektiv setzte sich aus 58 in der Klinik für Neurochirurgie der Philipps-Universität Marburg im Zeitraum von 1982 bis 1998 resezierten Meningeomen zusammen. Bereits in der Abteilung für Neuropathologie vorliegende, in Paraffin eingebettete Tumorböcke dienten der Erstellung von Gewebeschnitten. Ein HE-gefärbter Paraffinschnitt diente der Bestimmung des histologischen Typs und WHO-Grades durch einen erfahrenen Neuropathologen. In diesem Tumorkollektiv sah die Verteilung der WHO-Grade und histologischen Subtypen der WHO-Grad I Meningeome folgendermaßen aus:

WHO-Grad	Anzahl der Tumoren	Histologischer Subtyp
I	46	meningotheliomatös 19 fibroblastisch 7 transitionell 15 psammomatös 1 angiomatös 4
II	6	atypisch
III	6	anaplastisch

Tabelle 4-2 Übersicht des immunhistochemisch untersuchten Tumorkollektiv.

4.1.3 Untersuchte Genloci auf Chromosom 1

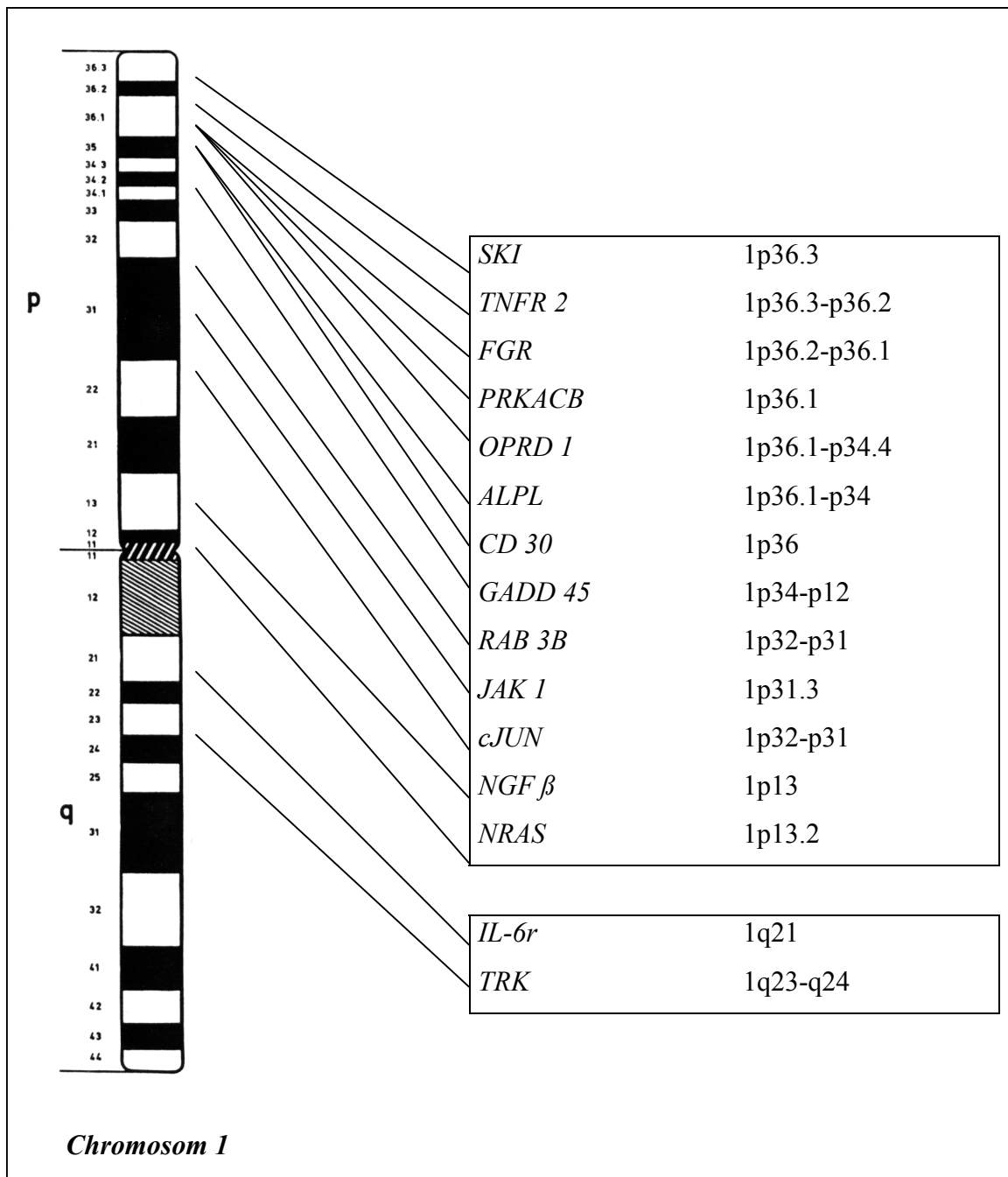


Abbildung 4-1 Untersuchte Loci in der Reihenfolge ihrer Lokalisation auf dem humanen Chromosom 1.

Bei der Auswahl der zu untersuchenden Genloci auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 wurde von der Lokalisation des *ALPL*-Gens ausgegangen, da die Deletion genomischer Sequenzen in diesem Bereich sowie Verlust der ALPL-Aktivität in vorhergehenden Untersuchungen mit maligner Progression in Meningeomen assoziiert wird (Niedermayer et al., 1997, Müller et al., 1999). Es wurden weitere Genloci in der Nachbarschaft dieser Region in Zentromerrichtung wie auch in Telomerrichtung untersucht, um zu versuchen, den Zielbereich der 1p-Deletionen in Meningeomen näher einzugrenzen. Bevorzugt wurden Gene gewählt, deren Involvierung in die Tumorigenese humaner Malignome als Tumorsuppressorgene oder Onkogene bereits in Diskussion steht, wie *NRAS*, *GADD45*, *cJUN*, *FGR*, *CD30*, *OPRD1* und *SKI* oder solche, die strukturelle Homologien zu bekannten derartigen Genen aufweisen wie *RAB3B* (Zahroui et al., 1989).

Darüberhinaus wurden zwei Loci auf dem Chromosom 1q als Kontroll-Loci untersucht, um eine 1p-Deletion von einem größerem Stückverlust mit Bruchstelle auf 1q oder einem totalen Verlust eines Chromosoms 1 abgrenzen zu können.

4.1.4 Oligonukleotide

4.1.4.1 Primer für die Reverse-Transkriptase-PCR

Die aufgeführten Oligonukleotide wurden in der Polymerasekettenreaktion in einer Endkonzentration von 15µM in TE eingesetzt. Anhand der Basensequenz der zu amplifizierenden Gene, entnommen aus der Genbank Database, wurde die Primer-Sequenz mit Hilfe eines Computer-Programms bestimmt. Synthetisiert wurden alle Oligonukleotide von MWG-Biotech, Ebersberg, BRD. Ausgehend von der vom Computer berechneten Schmelztemperatur der Primer wurde die in der Tabelle 4-3 aufgeführte ideale Schmelztemperatur („annealing-temperatur“) etabliert.

Primerbezeichnung	Locus	Fragmentgröße (bp)	Schmelztemp. ° C	Sequenz: sense Sequenz: antisense
hsTNFR2	<i>TNFR 2</i>	272	51	5'-GAC-CAG-GTG-GAA-ACT-CAA-G-3' 5'-CGT-GGA-TGA-AGT-CGT-GTT-3'
hsFGR	<i>FGR</i>	153	54	5'-CCA-AAG-GTA-GGG-GTG-GTG-3' 5'-CCG-TGT-GGT-GAT-GTA-GTA-ACC-3'
hsPRKACB	<i>PRKACB</i>	236	54	5'-GGC-TAT-CCC-CCA-TTC-TTT-G-3' 5'-GCT-TCA-ACC-TTC-CTC-TGG-TAA-3'
hsOPRD1	<i>OPRD 1</i>	197	54	5'-ATG-GTG-CTG-GTG-GTT-GTG-3' 5'-CGC-TTG-AAG-TTC-TCG-TCG-3'
hsALPL	<i>ALPL</i>	139	52	5'-GCA-TCC-TCA-AGG-GTC-AGC-3' 5'-CAC-TCT-CGT-GGT-GGT-CAC-A-3'
hsCD30	<i>CD 30</i>	140	50	5'-GCT-GCT-TCT-AAA-CTG-ACG-AGG-3' 5'-AGG-TAG-TAG-TCG-GGC-TCA-CAC-3'
hsgd45	<i>GADD 45</i>	162	50	5'-CAA-GTG-ACA-GCC-CCA-TTA-T-3' 5'-TTG-TTA-CCC-TGA-CCT-GAG-TG-3'
hscJUN	<i>cJUN</i>	276	58	5'-TGA-AGT-GAC-CCA-CTG-TTC-TAT-G-3' 5'-CCG-TTG-GCT-GGA-CTG-GAT-T-3'
hsRab3b	<i>RAB 3B</i>	172	54	5'-GAT-GGC-TTC-AGT-GAC-AGA-TGG-3' 5'-GAT-GCC-CAC-GGT-GCT-AAC-3'
hsJAK1	<i>JAK 1</i>	227	54	5'-CGA-CAA-TGA-GCA-GTC-AGT-GTG-3' 5'-CCA-GGA-GAG-CCA-TCC-CTA-3'
hsNGF β	<i>NGF β</i>	251	54	5'-CCC-TCC-ACA-GAG-TTT-TGG-C-3' 5'-GGA-CTT-GGG-GGA-TGG-TGT-3'
hsNRAS	<i>NRAS</i>	194	54	5'-GCC-ATC-AAT-AAT-AGC-AAG-TC-3' 5'-TGG-AAT-CCC-GTA-ACT-CTT-3'
hsIL-6r	<i>IL-6r</i>	249	54	5'-AGC-AAT-GTT-GTT-TGT-GAG-TGG-3' 5'-ACC-CTG-AAA-GGT-TTG-AGT-TTT-G-3'
hsSKI	<i>SKI</i>	195	54	5'-GCT-TCG-GCA-AGT-GTA-AGG-G-3' 5'-GGC-TCA-GCA-GGA-TGT-AGG-C-3'
hsTRK	<i>TRK</i>	122	50	5'-CTT-GGA-ACC-ACC-TGG-AGA-3' 5'-CTG-CCA-TAA-CCT-GAG-TAG-ACT-3'
D7S12	<i>β-Aktin</i>	180	61	5'-CTT-GAT-GAG-GTA-GTC-AGT-CAG-GTC-C-3' 5'-TAT-CCA-GGC-TGT-GCT-ATC-CCT-GTA-C-3'

Tabelle 4-3 Übersicht über die in der PCR eingesetzten Primer mit Genlocus, Fragmentgröße, idealer Schmelztemperatur und Sequenz.

4.1.4.2 Oligonukleotide für die Mikrosatellitenanalyse

Zur Detektion von „loss of heterozygosity“ (LOH) auf Chromosom 1p und 1q wurden die aufgeführten Mikrosatelliten-Marker eingesetzt. Die Sequenz der Primer, die mit den polymorphen Nukleotid-Wiederholungen flankierenden DNA-Abschnitten hybridisierten, wurde aus der „Sequence Tagged sites“ (STS) Database des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) entnommen. Synthetisiert wurden die fluoreszenzmarkierten Oligonuklotide in der Abteilung für Pathologie der TU-München.

Bezeichnung	Lokalisation	Sequenz: sense Sequenz: antisense	Produkt länge (bp)
CHLC.ATA4D06	1q31.3-q32.1	5'-GCA-AGC-CAA-GAT-TGT-GCC-3' 5'-CCC-TGC- ACC-CTT-AAT-CTC-TC-3'	139-140
CHLC.GATA72H07	1p32-p33	5'-AAA-GCA-CAG-TCC-ACA-CTC-CT-3' 5'-AGC-TCA-CCT-CCT-CCA-AGA-AG-3'	266-267
CHLC.GATA27F07	1p33-p34.2	5'-AGG-TGA-ACC-AAG-GGA-CCT-AG-3' 5'-AAA-AGG-AAA-TCT-CAA-AAT-TTT-CG-3'	114-115
AFM078yg5	1p36	5'-AGC-CAT-GAT-CAT-GAC-ACT-ACA-3' 5'-GAC-CAT-GTG-CTC-CGT-AAA-TA-3'	131

Tabelle 4-4 Eingesetzte Mikrosatellitenmarker mit Lokalisation, Sequenz der Oligonukleotide und Produktlänge.

4.1.5 Antikörper

Folgende Antikörper wurden zum Proteinnachweis mittels Western-Blot und Immunhistochemie eingesetzt:

Der Anti-RAB3B Antikörper (P-15) sc-305 wurde von Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, NM, USA, bezogen.

Der Anti-Alkalische Phosphatase Antikörper TRA-2-49/6E, spezifisch für die „gewebeunspezifische“, sog. liver/bone/kidney-Isoform des Enzyms (EC 3.1.3.1), wurde freundlicherweise von Herrn Professor P.W. Andrews, Department of Biomedical Science, University of Sheffield, UK, zur Verfügung gestellt.

Die meerrettichperoxidasekonjugierten anti-rabbit und anti-mouse Antikörper, die als

Zweitantikörper im Western Blot eingesetzt wurden, stammten von Innovative Systeme, Hamburg, BRD.

4.1.6 Puffer und Lösungen

Folgende Standardpuffer (nach Sambrook et al., 1989) wurden eingesetzt. Die Zusammensetzung weiterer verwendeter Lösungen findet sich an den entsprechenden Textstellen.

TE Puffer (pH 8,0)	10mM tris (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0)
TAE Puffer (pH 8,5)	40mM Tris-Acetat, 2mM EDTA (pH 8,5)
TBE Puffer	89mM Tris, 89mM Borsäure, 0,2mM EDTA
TBS Puffer (10x)	1M Tris, 9% NaCl
TTBS Puffer	TBS (1x), 0,1% Tween 20
DNA-Ladepuffer	95% Formid, 10mM NaOH, 0,5% Bromphenolblau 0,05% Xylen-Cyanol
SDS-Ladepuffer	312,5mM Tris-Cl (pH 6,8), 10% SDS, 0,5M DDT, 50% Glycerol, 0,5% Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS
Zelllyse-Puffer	20mM Tris-Cl (pH 7,5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton-X-100, 2,5mM Na-Pyrophosphat, 1mM β -Glycerolphosphat, 1mM Na_3VO_4 , 1 μg Leupeptin, 1mM PMSF
PBS (pH 7,4)	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na_2HPO_4 , 1,4mM KH_2PO_4
Triton-X-100	50mM Tris-Cl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100, 150mM NaCl

Tabelle 4-5 Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen.

4.2 Methoden

4.2.1 Extraktionstechniken

4.2.1.1 RNA- Extraktion

Die RNA-Extraktion aus den Tumorproben erfolgte mit einem RNeasy-Kit (Qiagen) entsprechend dem Herstellerprotokoll. Nach manueller Zerkleinerung der gefrorenen Gewebeprobe in einem Mörser unter RNase-freien Bedingungen wurde diese in einen Puffer aufgenommen und über eine mit einer Silica-Gel-Membran ausgestatteten Säule gegeben. Während der folgenden Waschschrte wurde die RNA an der Membran gebunden und zuletzt in RNase-freiem Wasser eluiert. Um Kontaminationen der RNA mit DNA zu umgehen, wurde ein DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set nach Protokoll angeschlossen. Nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung und einer Agarosegel-Elektrophorese mit nachfolgender EtBr-Färbung und UV-Illumination zum Ausschluss von DNA-Kontaminationen wurde die RNA bei -80° C aufbewahrt.

4.2.1.2 DNA-Extraktion

Extraktion der DNA aus Tumor- und Blutproben erfolgte mit Hilfe des QIAamp-Tissue-Kit (Qiagen) entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die DNA-Extraktion aus Blut erfolgte in Anwesenheit von Proteinase K durch eine 10minütige Inkubierung bei 70° C, während die Extraktion aus Tumorgewebe einer Inkubierung über Nacht bei 56° C bedurfte. Anschließend wurden die Gewebe- und Blutproben über eine Säule mit Silica-Gel Membran gegeben und die an der Membran gebundene DNA nach mehreren Waschschrten in TE eluiert. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung und elektrophoretischer Kontrolle (Agarose-Gel-Elektrophorese und EtBr-Färbung) auf Reinheit und Integrität wurde die DNA bei 4° C aufbewahrt.

4.2.1.3 Protein-Extraktion

Die Tumorproben wurden in 2 ml Zellysepuffer in sterilen Douncern auf Eis manuell zerkleinert. Anschließend wurde der Zelldebris für 15 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert und im Überstand die Proteinkonzentration mit der Methode nach Bradford (Bradford et al., 1989) bestimmt. Die extrahierten Proteine wurden bei -80°C aufbewahrt.

4.2.2 Reverse-Transkriptase –PCR (RT-PCR)

Zur Erststrangsynthese (cDNA) wurde jeweils 250ng RNA in einem Reaktionsgemisch aus 50mM Tris-HCl, 75mM KCl, 3mM MgCl_2 , 10mM DTT, 250 μM von jedem dNTP, 0,5 μl Hexanuklotid-Mix und 100U M-MLV Reverse Transkriptase mit einem Endvolumen von 20 μl eingesetzt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 90 min wurde das Gemisch zur Inaktivierung der M-MLV Reversen Transkriptase für 5 min auf 95°C erhitzt.

Für die spezifische PCR wurde jeweils 2,5 μl der cDNA in einem Endvolumen von 20 μl in einem Gemisch aus 10x Puffer (2 μl), dNTPs (1,6 μl), Taq-Polymerase (0,1 μl), DEPC (13,4 μl) und dem Primer in einer Konzentration von 15 μM unter den in der Tabelle 4-3 aufgeführten Bedingungen eingesetzt. Nach einer 5-minütigen Denaturierung der DNA bei 95°C folgte die gewünschte Anzahl an Zyklen (94°C für 1 min, spezifische Hybridisierungstemperatur des Primers für 1 min, 72°C für 2 min) und abschliessend eine Inkubation bei 72°C für 5 min. Um im linearen Amplifikationsbereich des PCR-Produktes zu bleiben, wurde die Anzahl der durchgeführten Zyklen auf 28-30 beschränkt.

4.2.3 Mikrosatellitenanalyse

Der Allelstatus der Mikrostelliten-Loci AFM078yg5 (1p36), CHLC.GATA27F07 (1p33-34.2), CHLC.GATA72H07 (1p32-p33) und CHLC.ATA4D06 (1q31.3-q32.1) wurde mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden als Primer für eine Cycling-Sequenzierung nach Standardprotokoll an genomischer DNA von 17 Patienten

durchgeführt. Die Sequenzierungsprodukte wurden auf einem automatischen ABI-Sequenzierer gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit dem Programm GeneScan Analysis 2.0.2 analysiert.

4.2.4 Elektrophorese

4.2.4.1 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese diente der Reinheitskontrolle der extrahierten DNA und RNA. Die mit 2µl Ladepuffer versetzten Proben wurden auf ein 0,5%-1,5% Agarose-Gel aufgetragen, das durch Lösung von Agarose in 1xTAE in der Mikrowelle erstellt wurde, und über 1h bei 60 V aufgetrennt. 1xTAE diente als Laufpuffer. Das Gel wurde anschließend für 5-10 min in 0,01% EtBr gefärbt und der Überschuß an EtBr durch ein ca. 30-minütiges Spülen des Gels in Aqua bidest. ausgewaschen. Auf einem UV-Transilluminator wurden die Nukleinsäurefragmente sichtbar gemacht und computergestützt dokumentiert, wobei ein standardisierter Marker (1kb DNA-Leiter) der Größenbestimmung diente.

4.2.4.2 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) und Silberfärbung

In einer nichtdenaturierenden PAGE (12,5% Polyacrylamid) wurden 10µl des jeweiligen PCR-Produktes, versetzt mit 2µl Ladepuffer, über 1h in 1xTBE Puffer bei ca. 125 V aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele einer Silberfärbung unterzogen: Fixierung in 10% Ethanol (5 min), Oxidierung in 1% Salpetersäure (3 min), Inkubation mit 12mM Silbernitrat (20 min) und Reduzierung in einer Lösung aus 0,28M Natriumcarbonat und 0,019% Formalin, bis die Banden detektabel wurden. Die Reaktion wurde mit 10% Eisessig gestoppt (2 min) und das Gel in Aqua bidest. gespült und auf Whatman-Papier getrocknet. Die Fragmentgröße wurde durch Vergleich mit einem standardisierten Größenmarker (1kb DNA-Leiter) bestimmt.

4.2.5 Western-Blot

Jeweils 10ng Protein wurde in einem 10% Polyacrylamid/SDS Gel bei einer Spannung von 100 V ca. 1h aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend in einem Puffersystem aus drei Puffern (Anodenpuffer I: 0,3M Tris, 20% Methanol; Anodenpuffer II: 25mM Tris, 20% Methanol; Kathodenpuffer: 25mM Tris, 40mM ϵ -amino-n-capronsäure, 20% Methanol) bei 400 mA und 300 V auf eine PVDF- Membran (Immobilion) transferiert (semi-dry Methode nach Sambrook et al., 1989). Die Laufzeit war von der Größe der Proteine abhängig (ALPL, 90kDa: 60 min, RAB3B, ca. 30kDa: 30 min). Die PVDF-Membran wurde anschliessend 4x15 min bei Raumtemperatur in 5% Magermilchpulver in TTBS geblockt und über Nacht mit einer 1:1000 (ALPL) bzw. 1:500 (RAB3B) Verdünnung des Primärantikörpers in TTBS bei 4° C inkubiert. Die Inkubierung mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (ALPL: anti-mouse, RAB3B: anti-rabbit) erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit einer 1:2000 Verdünnung des Antikörpers in 5% Magermilchpulver in TTBS. Anschließend wurde die Membran 60 sec mit ECL Chemolumineszens-Reagenz inkubiert, in Zellophanpapier eingeschlagen und einem X-OMAT MA-Film (unsensibel) und einem BioMax light Film (hochsensibel) exponiert und entwickelt.

4.2.6 Immunhistochemie

4.2.6.1 Durchführung der Immunhistochemie

Diese Untersuchung erfolgte nach der Immunperoxidase-Reaktion mit Hilfe des Vectorstain ABC-Elite-Peroxidase-KITs. Die Immunperoxidase-Färbemethode basiert auf der Bildung eines Strept-Avidin-Biotin-Komplexes.

Für die immunhistochemische Analyse wurden aus den in Paraffin eingebetteten Meningeompräparaten Schnitte der Dicke 2-4 μ m mit einem Schlittenmikrotom erstellt. Die Schnitte wurden 2 x 5 min in Xylol entparaffiniert, anschließend in der absteigenden Alkoholreihe hydratisiert (2 x 5 min in 100%igem-, 2 x 3 min in 96%igem- und 2 x 3 min in 70%igem Alkohol). Die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität erfolgte durch Inkubation für 20 min mit einem H₂O₂-Methanol-

Gemisch (1ml 30%iges H₂O₂ auf 100ml Methanol). Die Präparate wurden mit PBS-Puffer gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation der Schnitte mit in PBS-Puffer verdünntem Normalserum (50µl auf 2500µl PBS) bei Raumtemperatur für 20 min. Danach wurde mit dem ALPL-Antikörper 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Inkubation mit biotinyliertem Sekundär-Antikörper (30 min bei Raumtemperatur), nach Spülung mit PBS-Puffer die Inkubation mit Peroxidase-Komplex (Vectorstain-Elite-ABC-Peroxidase-Komplex) für 35 min bei Raumtemperatur. Mit Hilfe von DAB (3,3'- Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) wurde die Antikörperreaktion sichtbar gemacht. Die Präparate wurden mit Hämalaun gegengefärbt, 10 min mit Hilfe von Leitungswasser gebläut, über die aufsteigende Alkoholreihe entwässert und eingedeckt.

4.2.6.2 Auswertung der Immunhistochemie

Die Bewertung des Färbeargebnisses erfolgte nach dem modifizierten Remmele-Score (auch immunoreaktiver Score, IRS) (Remmele et al., 1986).

Anteil positiver Zellen (PP)	Färbeintensität (SI)	Punkte
0%	keine Anfärbung	0
1%-10%	schwache Reaktion	1
11%-50%	mäßige Reaktion	2
51%-80%	starke Reaktion	3
81%-100%	-	4

Tabelle 4-6 Übersicht der Punkteverteilung nach dem modifizierten Remmele-Score für den Anteil positiver Zellen und die Färbeintensität.

Das Produkt aus Färbeintensität (SI) und Prozentsatz positiver Zellen (PP) bildet den Remmele-Score, wobei Werte zwischen 0 und 12 resultieren.

4.2.7 Statistik

Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung wurden statistisch mit Hilfe des Fisher Exact Tests für kleine Stichproben bewertet.

5 ERGEBNISSE

5.1 Klinische Daten zu den untersuchten Tumoren

5.1.1 *Klinische und morphologische Daten zu den molekulargenetisch untersuchten Tumoren*

Bei den 25 mit molekulargenetischen Methoden (RT-PCR, Western-Blot und Mikrosatellitenanalyse) untersuchten Meningeomen handelte es sich um 18 benigne (WHO-Grad I), vier atypische (WHO-Grad II) und drei anaplastische (WHO-Grad III) Tumorvarianten. Die Verteilung der histologischen Subtypen unter den benignen Meningeomen ist der Tabelle 5-1 zu entnehmen. Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Tumoresektion lag bei 60 Jahren mit einer Altersspanne von 27 Jahren (M16) bis 78 Jahre (M8) und damit etwas unter dem in der Literatur berichteten Altersgipfel der Meningeomerkrankung (Louis et al., 2000). Aufgeschlüsselt nach dem Malignitätsgrad der Tumoren lag das Erkrankungsalter für benigne Meningeome durchschnittlich bei 56,8 Jahren, für atypische bei 57,3 Jahren und für anaplastische bei 65 Jahren. Die verfügbaren Tumorproben spiegeln nicht die epidemiologische Verteilung der WHO-Grade wider. Dadurch erklärt sich das unterschiedliche Geschlechterverhältnis in der Gesamtgruppe wie auch innerhalb der einzelnen WHO-Gruppen in Vergleich zu der in der Literatur berichteten Verteilung (Louis et al., 2000). Im untersuchten Tumorkollektiv betrug das Verhältnis Frauen: Männer 7:1. In den benignen Tumoren ergab sich ein Verhältnis von 17:1, in den atypischen von 3:1 und in den anaplastischen von 2:1. Trotz der relativ geringen Probenanzahl ist aber die Tendenz erkennbar, dass Meningeome deutlich häufiger bei Frauen auftreten, bei maligneren Varianten die Zahlen sich aber annähern.

Tumor- Nummer	WHO- Grad	Histologische Differenzierung	Alter des Patienten (Jahre)	Geschlecht des Patienten
M1	I	meningotheliomatös	43	w
M8	I	meningotheliomatös	78	w
M14	I	meningotheliomatös	57	w
M16	I	meningotheliomatös	27	w
M17	I	meningotheliomatös	72	m
M19	I	meningotheliomatös	44	w
M25	I	meningotheliomatös	48	w
M3	I	fibroblastisch	55	w
M4	I	fibroblastisch	57	w
M11	I	fibroblastisch	62	w
M12	I	fibroblastisch	52	w
M18	I	fibroblastisch	67	w
M26	I	fibroblastisch	57	w
M2	I	transitionell	68	w
M13	I	transitionell	57	w
M20	I	transitionell	52	w
M22	I	transitionell	74	w
M24	I	transitionell	54	w
M7	II	atypisch	60	w
M9	II	atypisch	75	m
M21	II	atypisch	37	w
M23	II	atypisch	?	?
M5	III	anaplastisch	66	w
M6	III	anaplastisch	74	m
M15	III	anaplastisch	55	w
N		Pacchionische Granulationen		

Tabelle 5-1 Klinische Daten, Malignitätsgrad und histologische Differenzierung der molekulargenetisch analysierten Meningeome. Die Tumoren sind nach ansteigendem WHO-Grad angeordnet. In dieser und allen folgenden Tabellen und Abbildungen steht M für Meningeom und N für die als Normalgewebe eingesetzten Pacchionischen Granulationen.

5.1.2 Klinische und morphologische Daten zu den immunhistochemisch untersuchten Tumoren

Insgesamt wurden 58 der im Zeitraum zwischen 1982 und 1998 in der Klinik für Neurochirurgie der Philipps-Universität Marburg resezierten Meningeome immunhistochemisch untersucht. Bei den analysierten Tumorvarianten handelte es sich um 46 benigne Meningeome (WHO-Grad I), sechs atypische Meningeome (WHO-Grad II) und sechs anaplastische Meningeome (WHO-Grad III). Die Verteilung der histologischen Subtypen der WHO-Grad I Meningeome lässt sich aus Tabelle 5-2 entnehmen.

Zwei der untersuchten Tumoren stellten Rezidive vorausgegangener Meningeome dar, diese sind in der Tabelle mit einem R (Rezidiv) gekennzeichnet. Tumor 44 entwickelte sich als Rezidiv von Tumor 16, beide Tumoren wurden dem WHO-Grad I zugeordnet. Dagegen wurde bei Tumor 55 (Rezidiv von Tumor 47) der Primärtumor als WHO-Grad II klassifiziert, während es sich bei dem Rezidiv um ein anaplastisches Meningeom handelte. In diesem Fall lag eine Tumorprogression im Laufe der Meningeomerkrankung vor.

Von den analysierten Tumorvarianten traten 37 in weiblichen Patienten, 21 in männlichen auf. Dieses fast 2:1 Verhältnis zugunsten des weiblichen Geschlechts stimmt mit der in der Literatur berichteten Geschlechtsverteilung überein (Louis et al., 2000). Ein höherer Prozentsatz männlicher Patienten in der Gruppe der atypischen und anaplastischen Meningeome konnte bei der kleinen Anzahl nicht bestätigt werden. Der Altersdurchschnitt lag im untersuchten Tumorkollektiv bei 58,8 Jahren, wobei die Altersspanne von 29 Jahren (Tumor 3) bis 86 Jahre (Tumor 1) reichte. Nach dem Malignitätsgrad differenziert lag der Altersdurchschnitt in der Gruppe der benignen Tumoren bei 57,5 Jahren, bei den atypischen bei 61,0 Jahren und bei den anaplastischen bei 65,3 Jahren. Die berichtete negative Korrelation zwischen Alter und WHO-Grad wurde in diesem Tumorkollektiv nicht unterstützt.

Tumor	WHO-Grad	Histologische Differenzierung	Alter des Patienten (Jahre)	Geschlecht des Patienten	Rezidiv
1	I	menigoth/fibromat/psammom	86	w	-
2	I	transitionell	67	w	-
3	I	meningotheliomatös	29	w	-
4	I	meningotheliomatös	69	w	-
5	I	transitionell	66	w	-
6	I	transitionell	70	w	-
7	I	meningotheliomatös	66	w	-
8	I	meningotheliomatös	58	m	-
9	I	angiomatös	59	m	-
10	I	meningotheliomatös	71	w	-
11	I	meningotheliomatös	55	w	-
12	I	meningotheliomatös	31	w	-
13	I	fibromatös	54	w	-
14	I	fibromatös	46	m	-
15	I	fibromatös	42	w	-
16	I	meningotheliomatös	34	w	-
17	I	meningotheliomatös	48	w	-
18	I	meningotheliomatös	66	m	-
19	I	meningotheliomatös	66	m	-
20	I	meningotheliomatös	55	w	-
21	I	meningotheliomatös	56	w	-
22	I	meningotheliomatös	74	m	-
23	I	meningotheliomatös	37	w	-
24	I	meningotheliomatös	35	w	-
25	I	transitionell	64	w	-
26	I	meningotheliomatös	59	w	-
27	I	transitionell	70	w	-
28	I	transitionell	44	m	-
29	I	fibroblastisch	75	w	-
30	I	fibroblastisch	72	m	-
31	I	fibroblastisch	53	m	-
32	I	transitionell	55	m	-

33	I	transitionell	78	m	-
34	I	transitionell	38	w	-
35	I	transitionell	51	m	-
36	I	transitionell	53	w	-
37	I	transitionell	47	w	-
38	I	transitionell	82	w	-
39	I	psammomatös	69	m	-
40	I	angiomatös	63	m	-
41	I	angiomatös	81	m	-
42	I	angiomatös	62	w	-
43	I	transitionell	52	m	-
44	I	meningotheliomatös	35	w	R von 16
45	I	fibroblastisch	43	w	-
46	I	transitionell	61	m	-
47	II	atypisch	73	w	-
48	II	atypisch	65	m	-
49	II	atypisch	68	w	-
50	II	atypisch	35	w	-
51	II	atypisch	54	m	-
52	II	atypisch	71	w	-
53	III	anaplastisch	57	m	-
54	III	anaplastisch	59	m	-
55	III	anaplastisch	74	w	R von 47
56	III	anaplastisch	67	w	-
57	III	anaplastisch	80	w	-
58	III	anaplastisch	55	w	-

Tabelle 5-2 Klinische Daten, histologische Differenzierung und WHO-Grad der immunhistochemisch untersuchten Meningeome. Die Tumoren sind in der Tabelle nach ansteigendem WHO-Grad angeordnet. R steht für Rezidiv der jeweils angegebenen Tumornummer.

5.2 Expressionsanalyse für ausgewählte 1p-spezifische Transkripte

Um den Zielbereich von Deletionen auf dem kurzen Arm des humanen Chromosoms 1 in Meningeomen näher einzugrenzen, wurde in dieser Arbeit die mRNA-Expression ausgewählter Gene, deren Lokalisation im Bereich der vermuteten Deletion bekannt ist, untersucht. Anhand von mRNA-Transkriptionsdefiziten sollte auf den Zustand der genomischen DNA in diesem Bereich rückgeschlossen werden.

Mit Hilfe genspezifischer Primer wurden mRNA-Fragmente amplifiziert, die dem Transkript der zu untersuchenden Gene entsprechen. Als Beweis für die Spezifität der PCR mit den jeweiligen Primern galt eine einzelne Bande mit der Größe, die für den eingesetzten Primer zu erwarten war. Um eine Kontamination der Primer auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle pro Primer mitgeführt.

Eine interne Kontrolle der jeweils eingesetzten cDNA wurde mit β -Aktin, einem sogenannten Haushaltsgen („house-keeping gene“), durchgeführt. Eine konstante und quantitativ gleichmäßige Expression von β -Aktin in allen untersuchten Proben bewies die vollständige Umwandlung der eingesetzten mRNA in cDNA während der RT-PCR.

Die Banden wurden entsprechend ihrer Intensität als negativ (-), d.h. keine Expression des untersuchten Genes, schwach positiv (+), d.h. geringgradige Expression des untersuchten Genes, und stark positiv (++), d.h. deutliche Expression des untersuchten Genes, bewertet.

Die Expression der untersuchten 1p-spezifischen Transkripte sowie die der Kontroll-Loci auf Chromosom 1q ist in Tabelle 5-3 dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	N
WHO	I	I	I	I	III	III	II	I	II	I	I	I	I	III	I	I	I	I	I	II	I	II	I	I	I	
<i>SKI</i>	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	++	-	++	-	++	-	+	-
<i>TNFR2</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	+	++	++	++	++	++	+	++	++	++	+	++	++
<i>FGR</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	++
<i>PRKACB</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>OPRD1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ALPL</i>	++	-	++	+	-	+	-	++	-	-	++	++	++	-	++	-	+	-	++	++	++	-	++	++	++	++
<i>CD30</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>GADD45</i>	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	++	++	++	-	++	+	++	++	++	+	++	++	++	-	++	++
<i>RAB3B</i>	++	-	++	-	-	-	+	++	-	-	++	++	++	-	++	+	+	-	+	-	++	++	+	++	++	++
<i>JAK1</i>	++	-	++	++	+	-	++	++	++	-	++	++	++	+	++	++	+	+	+	+	+	++	++	++	++	+
<i>cJUN</i>	++	++	++	+	++	++	++	++	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>NGFβ</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+
<i>NRAS</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>IL-6r</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	++	-	++	++	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++
<i>TRK</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Tabelle 5-3 mRNA-Expression der analysierten Gene. Die untersuchten Tumoren sind nach ansteigender Probennummer in der Tabelle angeordnet. Abhängig von der detektierten Bande wird die mRNA-Expression als stark (++), schwach (+) oder negativ (-) bewertet. Die Loci sind in der Reihenfolge ihrer Lokalisation auf Chromosom 1 angeordnet.

Das Transkript des Protoonkogenes *SKI* wurde von 16 der untersuchten Meningeome wie auch von den Pacchionischen Granulationen nicht exprimiert. Interessanterweise zeigten die weiteren neun analysierten Meningeome eine schwache bis deutliche Expression des *SKI*-Transkriptes (Abbildung 5-1 und Tabelle 5-3). Hervorzuheben ist, dass es sich bei den Meningeomen mit *SKI*-Transkription zum größten Teil um benigne WHO-Grad I Tumoren handelte: unter den neun Meningeomen mit detektierter *SKI*-mRNA waren sieben benigne und nur zwei Tumoren der WHO-Grade II und III vertreten.

Ein *TNFR2*-Transkript konnte in allen untersuchten Meningeomen wie auch im untersuchten Arachnothelgewebe nachgewiesen werden (Abbildung 5-1 und Tabelle 5-3). In einigen Tumorvarianten (M11, M12, M15, M21 und M25) fand sich eine schwächere Expression als in den restlichen analysierten Meningeomen. Es bestand aber keinerlei Korrelation zwischen der Expressionsstärke von *TNFR2* und dem Malignitätsgrad der jeweiligen Tumoren.

Die mRNA des *FGR*-Gens wurde in den untersuchten Meningeomen nicht exprimiert (Abbildung 5-1, Tabelle 5-3) mit Ausnahme einer schwachen Expression in Tumor 12 und 22. Bei *FGR* handelt es sich um ein Gen, welches hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Pacchionische Granulationen sind sehr stark durchblutetes Gewebe, entsprechend stark war hier die Expression des *FGR*-Transkriptes. Vermutlich lag auch in Tumor 12 und 22 ein derart hoher Blutgehalt vor, dass es hier zur Amplifikation des Transkriptes für *FGR* kommen konnte.

Die mRNA von *PRKACB* wurde in allen untersuchten Tumoren mit Ausnahme der Meningeome M11 und M15 wie auch im meningealen Normalgewebe detektiert (Abbildung 5-2 und Tabelle 5-3). Es bestanden keine Unterschiede hinsichtlich der Quantität der mRNA-Expression zwischen den einzelnen Tumoren.

Das Transkript des *OPRD1*-Locus konnte in dem analysierten Tumorkollektiv wie auch im untersuchten meningealen Normalgewebe nicht gefunden werden (Abbildung 5-2 und Tabelle 5-3).

Betreffend der mRNA-Expression des *ALPL*-Gens fanden sich in dem analysierten Tumorkollektiv starke Variationen (Abbildung 5-2, Tabelle 5-3). Das untersuchte meningeale Normalgewebe zeigte eine deutliche Expression der *ALPL*-mRNA. Transkriptionsverlust für *ALPL* wurde in den Meningeomen mit höherem Malignitätsgrad häufiger gefunden als in den benignen Tumorvarianten: fünf der sieben WHO-Grad II/III Tumoren wiesen einen Expressionsverlust des *ALPL*-Transkriptes auf,

während nur vier der 18 benignen WHO-Grad I Meningeome einen Verlust dieses Transkriptes zeigten.

Die mRNA des *CD30*-Locus wurde in den analysierten Tumoren wie auch in den untersuchten Pacchionischen Granulationen im Wesentlichen nicht detektiert (Abbildung 5-3 und Tabelle 5-3). Eine minimale Expression des *CD30*-Transkriptes in den Meningeomen M17 und M22 muss vermutlich auf Fehler/Kontamination zurückgeführt werden.

Bei der Analyse der Transkription des *GADD45*-Gens fanden sich auffallende Unterschiede im Tumorkollektiv (Abbildung 5-3, Tabelle 5-3). Meningeales Normalgewebe zeigte eine starke Expression des *GADD45*-Transkriptes. Expressionsdefizite für *GADD45* waren eindeutig in den aggressiveren Tumorvarianten konzentriert. Insgesamt wiesen vier der sieben untersuchten WHO-Grad II/III Tumoren einen Transkriptionsverlust für *GADD45* auf, während nur sechs der 18 analysierten WHO-Grad I Meningeome einen mRNA-Verlust zeigten.

Auch die mRNA-Expression des *RAB3B*-Gens differierte deutlich (Abbildung 5-3 und Tabelle 5-3). Im Arachnothelgewebe wurde das Transkript des *RAB3B*-Locus eindeutig detektiert. Ein Transkriptionsverlust für *RAB3B* kumulierte im Bereich der WHO-Grade II und III Tumoren. In fünf der sieben atypischen/anaplastischen Meningeome liess sich keine mRNA für *RAB3B* nachweisen, von den 18 benignen Tumoren wiesen nur vier einen Transkriptionsverlust auf.

Die Transkriptionsanalyse des *JAK1*-Gens ergab im gesamten Tumorkollektiv mit Ausnahme der Meningeome M2, M6 und M11 eine deutlich sichtbare Detektion des geforderten Transkriptes (Abbildung 5-4, Tabelle 5-3). Im meningealen Normalgewebe war die mRNA für *JAK1* ebenfalls nachzuweisen.

In allen Meningeomen wie auch im Arachnothelgewebe konnte *cJUN*-mRNA detektiert werden, allerdings in unterschiedlicher Intensität. In den Tumoren M4, M9, M11, M15, M16, M17, M18 und M19 fiel eine schwächere Expression auf als in den übrigen Meningeomen (Abbildung 5-4 und Tabelle 5-3).

mRNA für *NGFβ* wurde in den Pacchionischen Granulationen schwach amplifiziert. Von den untersuchten Meningeomen zeigten nur die Tumoren M14, M16 und M24 eine Expression der gesuchten mRNA (Abbildung 5-4 und Tabelle 5-3). Bei diesen drei Tumoren handelte es sich um benigne Meningeome.

Das Transkript für *NRAS* wurde in allen analysierten Tumoren und im meningealen Normalgewebe detektiert (Abbildung 5-5 und Tabelle 5-3). Die Tumoren M11 und M15

zeigten eine schwächere Bande als die übrigen Meningeome. Eine Korrelation zwischen schwächerer Expression des Transkriptes und Malignitätsgrad konnte nicht gefunden werden.

mRNA des *IL-6r*-Gens wurde in allen Tumoren mit Ausnahme von M5, M6, M11, M14 und M15 wie auch im meningealen Normalgewebe exprimiert (Abbildung 5-5 und Tabelle 5-3). Interessanterweise handelte es sich bei drei der fünf Tumoren, die einen *IL-6r*-Expressionsverlust aufwiesen, um anaplastische Meningeome. Dagegen konnte ein Expressionsverlust der *IL-6r*-mRNA nur in zwei der 18 benignen Tumoren nachgewiesen werden.

Eine Expression des *TRK*-Transkriptes war in allen untersuchten Tumoren mit Ausnahme des anaplastischen Meningeoms M15 deutlich zu sehen (Abbildung 5-5, Tabelle 5-3). Auch im meningealen Normalgewebe wurde *TRK*-mRNA deutlich amplifiziert.

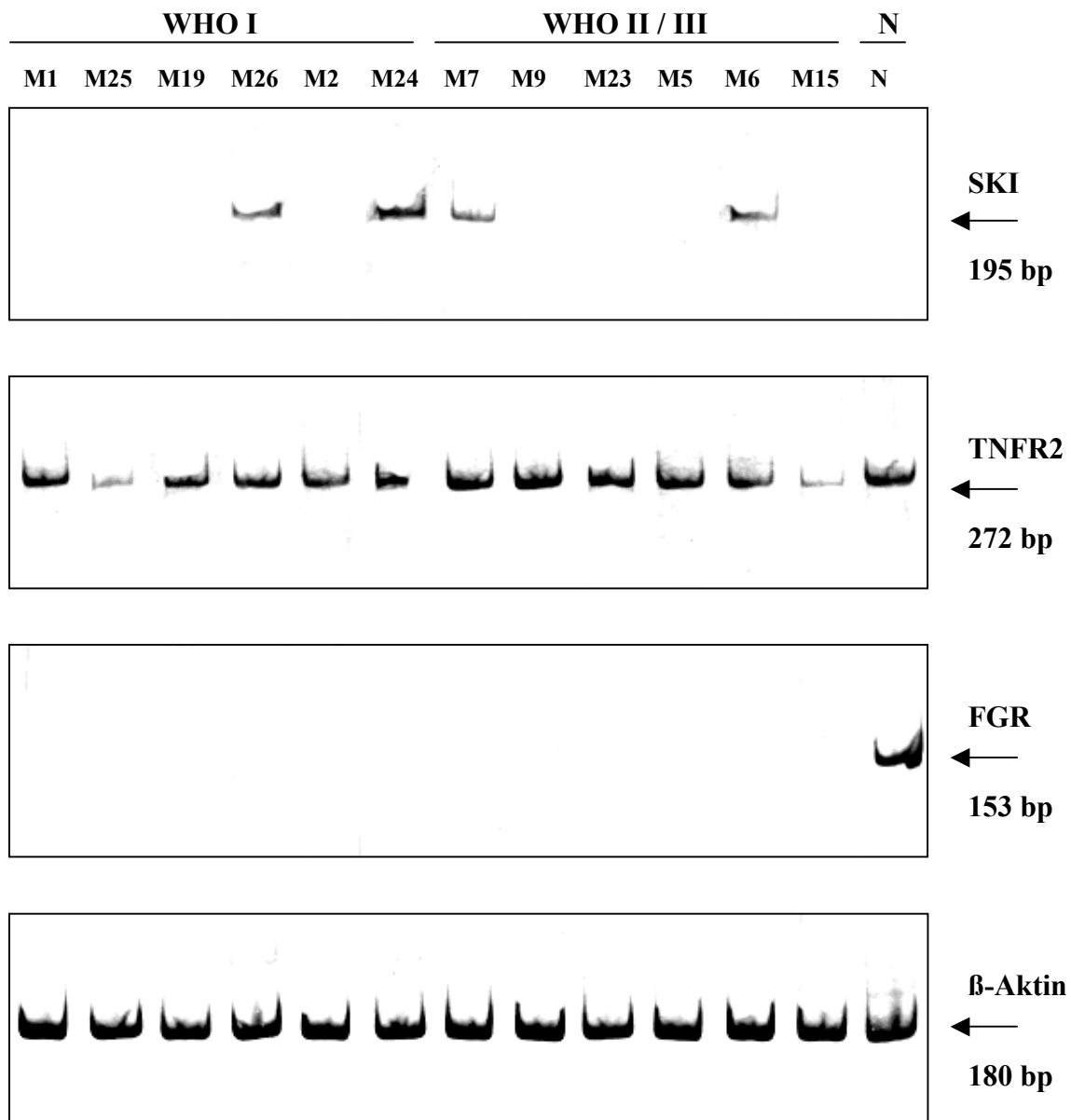


Abbildung 5-1 RNA-Fragmente der Gene *SKI*, *TNFR2* und *FGR* aus Meningeomen und meningealem Normalgewebe. Hier werden für das analysierte Tumorkollektiv repräsentative Beispiele der mRNA-Fragmente im PAA-Gel dargestellt. In einigen der untersuchten Meningeome findet sich eine Exprimierung von *SKI*, hierbei handelt es sich vor allem um benigne Tumorvarianten. *TNFR2* wird von allen Meningeomen wie auch vom Arachnothel exprimiert, die Unterschiede in der Intensität der Expression zeigen keinerlei Korrelation mit dem WHO-Grad der Tumoren. *FGR* wird im untersuchten Tumorkollektiv nicht transkribiert. Die detektierte *FGR*-mRNA im meningealen Normalgewebe ist vermutlich auf den erhöhten Gehalt dieses Gewebes an Blutgefäßen zurückzuführen. *β-Aktin* zeigt in allen Meningeomen eine gleichmäßige Expression.

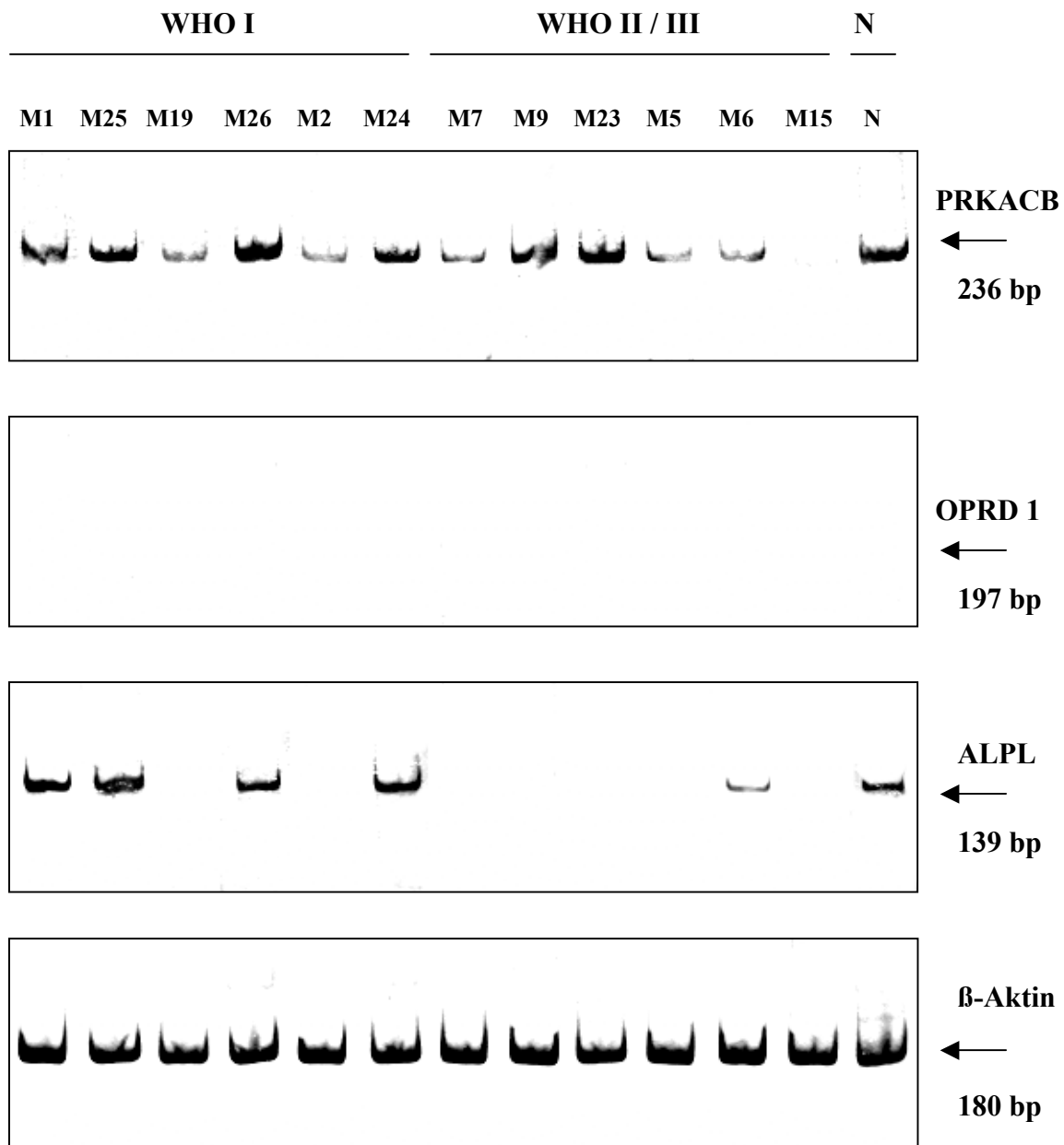


Abbildung 5-2 RNA-Fragmente im PAA-Gel für *PRKACB*, *OPRD1* und *ALPL* in Meningeomen und meningealem Normalgewebe. Die abgebildeten Tumoren stellen repräsentative Beispiele für das analysierte Tumorkollektiv dar. Die *PRKACB*-mRNA wird in allen abgebildeten Meningeomen mit Ausnahme des anaplastischen Tumors M15 wie auch im Arachnothel exprimiert. *OPRD1* wird in Meningeomen wie auch im Arachnothel nicht transkribiert. Die Transkriptionsanalyse für *ALPL* zeigt Defizite, die eindeutig bei den malignen Tumorvarianten kumulieren. Die mRNA für *β-Aktin* wird in allen Tumoren gleichmäßig exprimiert.

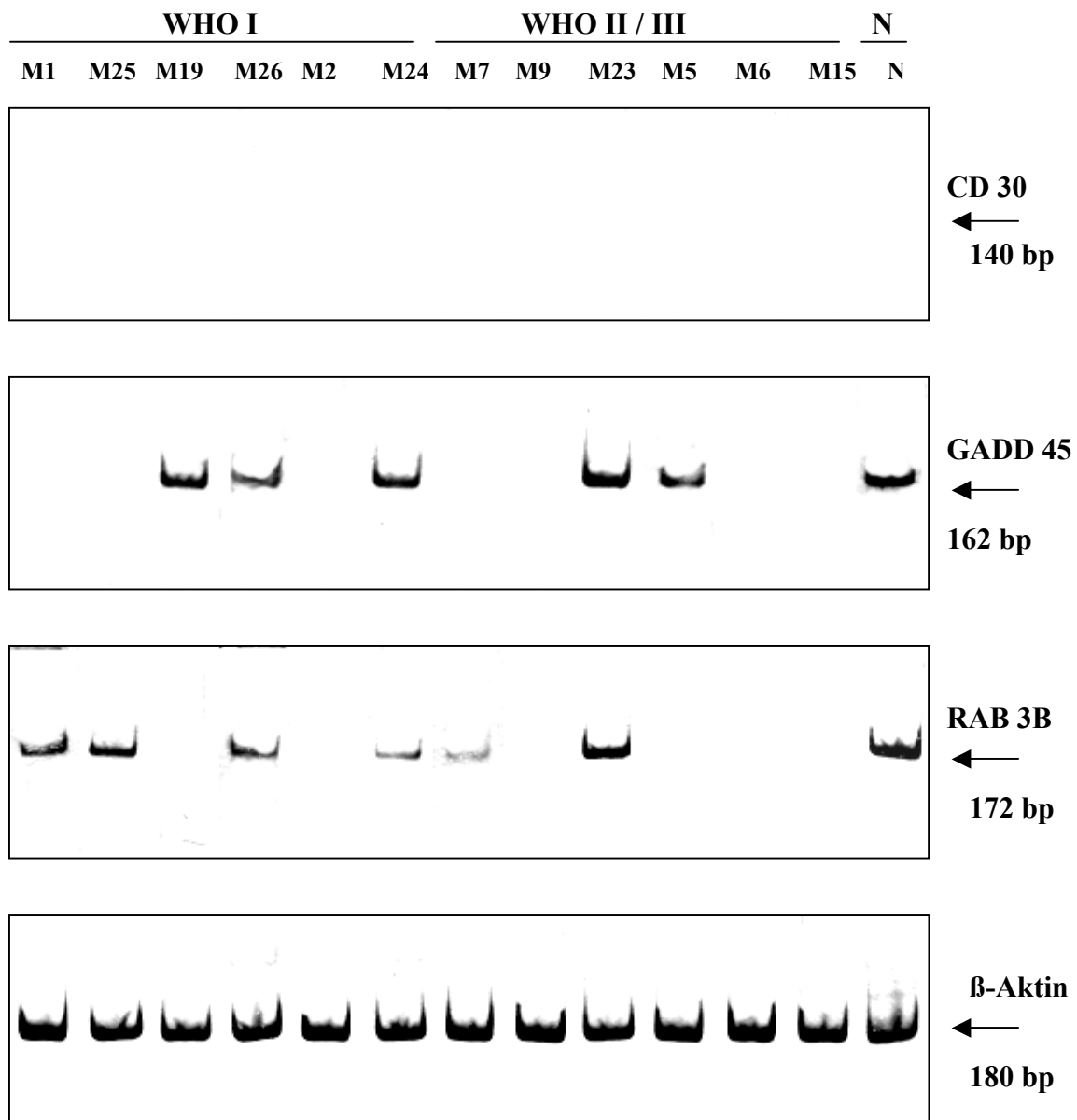


Abbildung 5-3 RNA-Fragmente der Gene *CD30*, *GADD45* und *RAB3B* in Meningeomen und meningealem Normalgewebe. Hier sind repräsentative Beispiele für das analysierte Tumorkollektiv abgebildet. *CD30* wird in Meningeomen wie auch im Arachnothel nicht transkribiert. Die Transkription der Gene *GADD45* und *RAB3B* zeigt sich in den untersuchten Meningeomen sehr variabel, wobei Transkriptionsdefizite häufiger in den WHO II- und III-Tumoren zu finden sind. *β -Aktin* wird in allen Meningeomen gleichmäßig transkribiert.

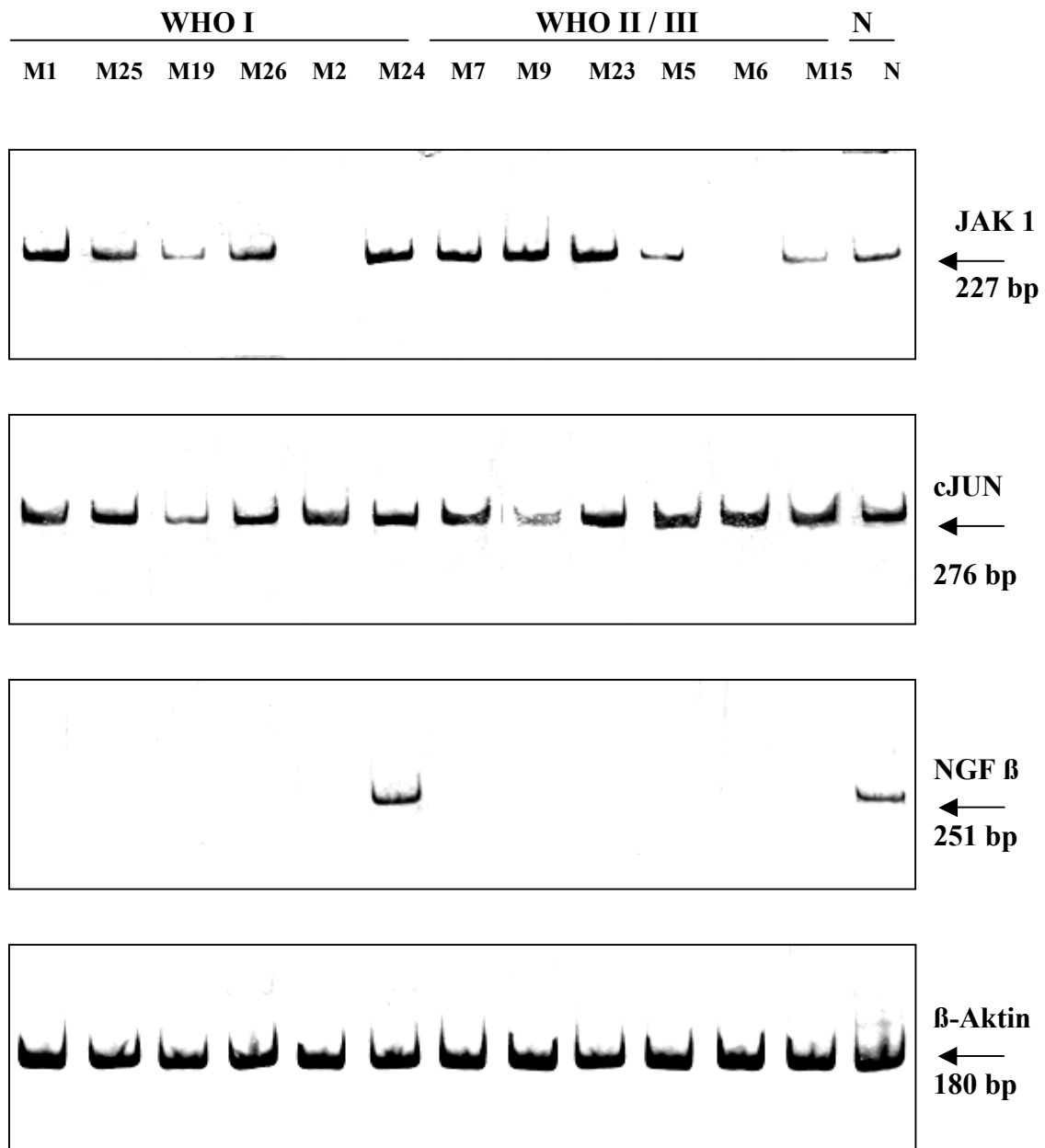


Abbildung 5-4 RNA-Fragmente für *JAK1*, *cJUN* und *NGF β* in Meningeomen und meningealem Normalgewebe. Repräsentative Beispiele für das analysierte Tumorkollektiv sind hier abgebildet. Die mRNA für *JAK1* wird von wenigen Ausnahmen abgesehen in allen Tumoren detektiert. *cJUN* wird in allen untersuchten Meningeomen transkribiert, es bestehen Unterschiede in der Intensität, die aber keine Korrelation mit dem WHO-Grad zeigen. Die mRNA für *NGF β* wird im Tumorkollektiv bis auf drei Tumoren nicht detektiert, im Normalgewebe zeigt sich eine schwache Expression. Die mRNA für *β -Aktin* wird überall gleichmäßig detektiert.

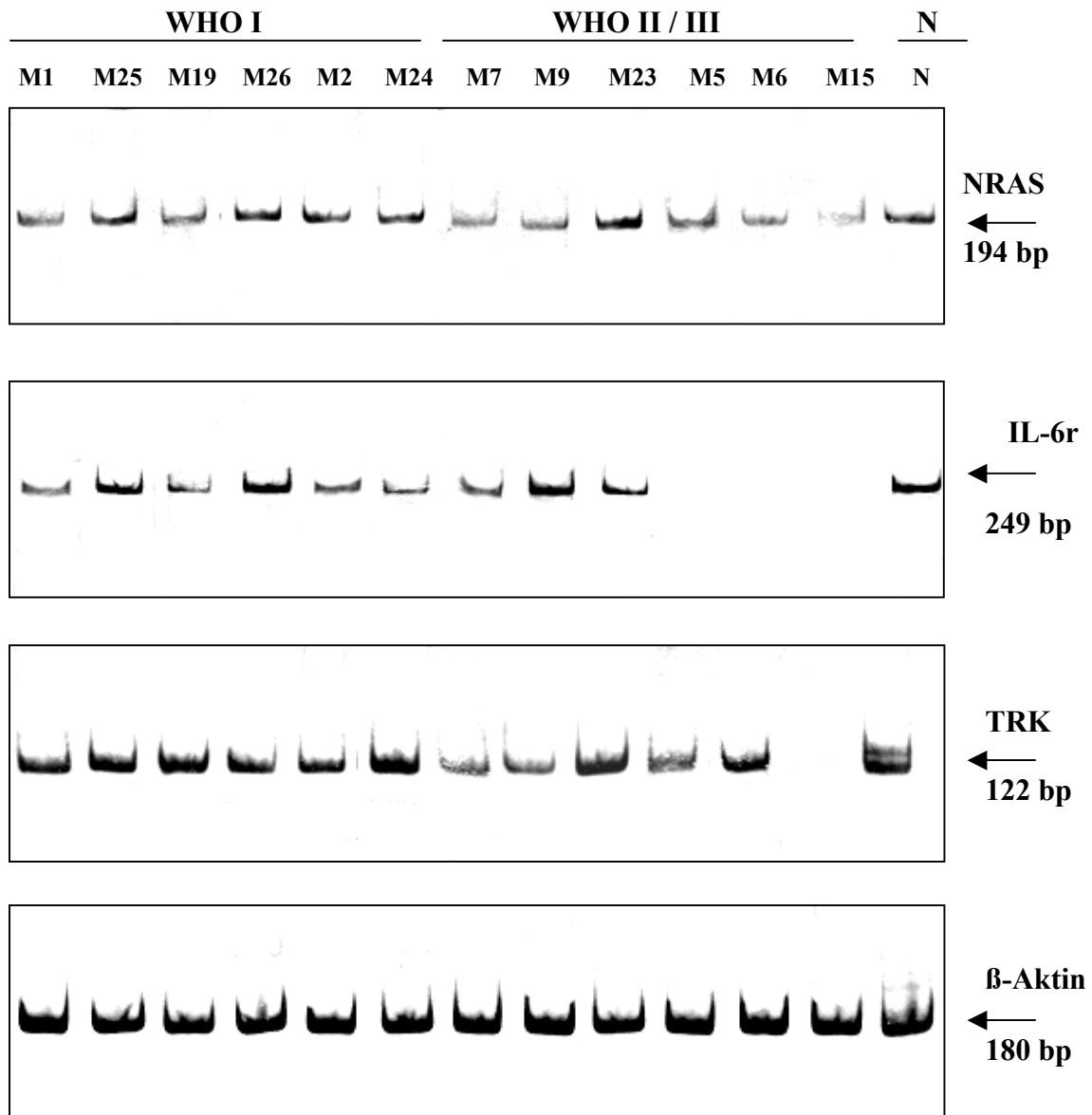


Abbildung 5-5 RNA-Fragmente der Gene *NRAS*, *IL-6r* und *TRK* in Meningeomen und meningealem Normalgewebe. Für das analysierte Tumorkollektiv repräsentative Beispiele sind hier abgebildet. *NRAS* wird in allen Meningeomen transkribiert, wobei Intensitätsdifferenzen vorkommen. Das Gen *IL-6r* wird in allen dargestellten Meningeomen mit Ausnahme der drei anaplastischen Tumoren M5, M6 und M15 transkribiert. Die *TRK*-mRNA wird in allen Tumoren außer in M15 detektiert. Das Transkript des *β-Aktin* Gens ist in allen analysierten Meningeomen gleichmäßig exprimiert.

5.3 Analyse der erstellten Expressionskarte

Die Analyse der erstellten Expressionskarte erfolgte unter zwei Gesichtspunkten. Zum einen sollte der Bereich der häufigsten Transkriptionsverluste bestimmt werden, um auf den Zielbereich einer genomischen Veränderung rückschließen zu können. Außerdem interessierte die Korrelation mit dem WHO-Grad der untersuchten Tumoren, mit dem Ziel, einen Zusammenhang zwischen genomischen Veränderungen auf 1p und Wachstumsverhalten der Meningeome zu erkennen.

In der Tabelle 5-4 wurden die Loci, deren mRNA-Expression in den untersuchten Meningeomen und im untersuchten meningealen Normalgewebe negativ war oder als unspezifisch gewertet wurde, nicht mehr dargestellt. Verglichen mit der Tabelle 5-3 fielen daher *FGR*, *OPRD1*, *CD30*, und *NGFβ* von den untersuchten Markern auf dem humanen Chromosom 1 weg.

Außerdem wurde in dieser Tabelle auf die Darstellung der mRNA-Expression des *SKI*-Gens verzichtet, das im Normalgewebe keine Expression zeigte, in einigen Tumoren aber exprimiert wurde. Dass die Expression eher in benignen Meningeomen zu detektieren war, ist diskussionsbedürftig.

Die Tumoren wurden nach ansteigendem WHO-Grad angeordnet. Expressionsverlust eines Transkriptes wurde als schwarz ausgefüllter Kreis dargestellt, während mRNA-Expression als nicht ausgefüllter Kreis abgebildet wurde.

Ein Vergleich des Expressionsmusters der beiden Chromosomenarme zeigte deutlich, dass Verluste auf 1p wesentlich häufiger auftraten als Verluste auf 1q. Von den untersuchten Meningeomen zeigten insgesamt 15 Tumoren einen Verlust auf 1p, während nur 5 der untersuchten Tumoren einen Verlust auf 1q aufwiesen. Bei einer kleinen Gruppe von Tumoren (M11, M5, M6 und M15) fanden sich Veränderungen auf beiden Chromosomenarmen.

Da die Reihenfolge der Gene auf 1p nicht endgültig geklärt ist, war es in einigen Fällen schwierig zu beurteilen, ob die 1p-Deletionen endständig und interstitiell oder nur endständig lokalisiert waren, wie man es bei Bruchstellen chromosomaler Abschnitte erwarten würde. Die Transkriptionsdefizite auf 1p akkumulierten deutlich in einem bestimmten Bereich des Chromosoms und zwar in dem Bereich, in welchem die Gene *ALPL*, *GADD45* und *RAB3B* lokalisiert sind. Weiterhin wurde deutlich, dass sich die detektierten Transkriptionsdefizite eindeutig in den atypischen und anaplastischen Tumorvarianten konzentrierten.

		WHO I																WHO II / III										
		1	2	3	4	8	11	12	13	14	16	17	18	19	20	22	24	25	26	21	23	7	9	5	6	15	N	
1p	TNFR2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	PRKACB	○	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	
	ALPL	○	●	○	○	○	●	○	○	○	○	●	○	●	○	○	○	○	○	○	●	●	●	●	○	●	○	
	GADD45	●	●	●	●	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	○	○	●	●	○	●	●	○	
	RAB3B	○	●	○	●	○	●	○	○	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○	●	○	○	●	●	●	●	○	
	JAK1	○	●	○	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	
	cJUN	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	NRAS	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
1q	IL-6R	○	○	○	○	○	●	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	●	●	○
	TRK	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

Tabelle 5-4 Die untersuchten Tumoren sind nach ansteigendem Malignitätsgrad angeordnet. Bei der Darstellung der auf Transkriptionsdefizite hin untersuchten Loci wird auf die Abbildung jener Loci verzichtet, deren mRNA-Expression im Normalgewebe wie in den Meningeomen konstant negativ ist. Transkriptionsverlust ist als schwarz ausgefüllter Kreis, Expression als nicht ausgefüllter Kreis dargestellt.

Jedes der untersuchten Meningeome der WHO-Grade II und III (7 von 7 Tumoren) zeigte zumindest im Bereich eines der untersuchten Loci auf 1p einen Expressionsverlust, während dies nur bei 8 der untersuchten 18 benignen Meningeomen der Fall war. Statistisch erwies sich ein Expressionsverlust bei den WHO II/III-Tumoren als signifikant häufiger ($p = 0,02$; Fisher's Exact Test, 2-seitige Signifikanz) als bei den WHO I-Tumoren.

5 der 7 untersuchten WHO II/III-Meningeome zeigten einen Transkriptionsverlust für *ALPL*, während nur 4 der 18 untersuchten benignen Meningeome einen Transkriptionsverlust dieses Gens zeigen. Ein mRNA-Expressionsverlust für *GADD45* fand sich in 4 von 7 der malignen Meningeomen, dagegen nur in 6 der untersuchten 18 WHO I-Tumoren. Ähnliche Verhältnisse fanden sich bezüglich des *RAB3B*-Gens: 5 der 7 untersuchten WHO II/III-Meningeome zeigten einen Expressionsverlust, während nur 4 der 18 benignen Meningeome einen *RAB3B* mRNA-Expressionsverlust aufwiesen (Tabelle 5-5). Trotz der signifikant größeren Häufigkeit von Gendefekten bei Tumoren der WHO-Grade II und III, ließ sich für die einzelnen Gene nur ein Trend, aber keine statistische Signifikanz nachweisen: für *ALPL* und *RAB3B* ergab sich eine 2-seitige Signifikanz von $p = 0,058$, für *GADD45* eine 2-seitige Signifikanz von 0,378.

	ALPL	GADD 45	RAB 3B
WHO I	14 / 18	12 / 18	14 / 18
WHO II	1 / 4	2 / 4	2 / 4
WHO III	1 / 3	1 / 3	0 / 3

Tabelle 5-5 Korrelation der mRNA-Expression der Gene *ALPL*, *GADD45* und *RAB3B* mit dem Malignitätsgrad der analysierten Meningeome.

Aus den Untersuchungen läßt sich ableiten, dass der Zielbereich der chromosomalen Veränderung auf den kurzen Arm des humanen Chromosom 1 wahrscheinlich im Bereich der Loci für *ALPL*, *GADD45* und *RAB3B* liegt. Ein einzelnes Zielgen liess sich anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht definieren.

Die deutliche Konzentration der Transkriptionsdefizite im Bereich der malignen Tumorvarianten bestätigt die Progressionsassoziation der Veränderungen auf dem

kurzen Arm des Chromosoms 1 in Meningeomen. Die Bedeutung dieser Veränderungen als prädiktiver Faktor für das Wachstumsverhalten von Meningeomen wird durch die Ergebnisse dieser Studie unterstützt.

5.4 Protein-Expressionsanalyse für zwei progressionsassoziiert transkriptionsdefiziente Loci

Um die auf mRNA-Ebene detektierten progressionsassoziierten Transkriptionsverluste einiger Loci auf Chromosom 1p in humanen Meningeomen zu unterstreichen und hinsichtlich ihrer Ätiologie besser beurteilen zu können, sollte die Expression der jeweiligen Genprodukte mittels Western-Blot-Analyse kontrolliert werden.

Da für *ALPL* und *RAB3B* deutliche Transkriptionsdefizite korrelierend mit dem Malignitätsgrad der Meningeome nachgewiesen wurden (Tabelle 5-4), wurden deren Genprodukte für die Protein-Expressionsanalyse ausgewählt.

Die Proteinexpression wurde positiv gewertet, wenn in der Western-Blot-Analyse immunreaktive Banden des erwarteten Molekulargewichts der spezifischen Antikörper sichtbar wurden (*ALPL* 90 kDa, *RAB3B* ca. 30 kDa).

Abhängig von der Intensität der immundetektierten Bande wurde die Expression des Proteins als stark positiv (++), schwach positiv (+) oder negativ (-) interpretiert.

Auf den Proteinnachweis in den Meningeomen M8, M25, M22 und M15 mußte verzichtet werden, da die geringen vorhandenen Gewebemengen nach der RNA-Isolierung keine Proteinextraktion mehr erlaubten.

Die Western-Blot-Analysen sind in Abbildung 5-6 und 5-7 dargestellt. Die Resultate der Western-Blot-Analysen zum Nachweis der Proteine *ALPL* und *RAB3B* sind in Tabelle 5-6 zusammengestellt. Die untersuchten Tumoren sind nach ansteigendem Malignitätsgrad angeordnet.

Im meningealen Normalgewebe fand sich eine deutliche *ALPL*-Expression. Auch in 15 der 21 untersuchten Tumorvarianten ließ sich *ALPL* detektieren. Ein Expressionsverlust des *ALPL*-Proteins fand sich in den Tumoren M17, M2, M9, M25, M5 und M6. Bei vier der sechs Meningeome, bei denen kein *ALPL* nachweisbar war, handelte es sich um atypische oder anaplastische Tumoren, bei den übrigen zwei *ALPL*-defizienten Tumoren um benigne Meningeome. Mit dem Fisher's-Exact-Test ergab sich eine

signifikante Häufung des ALPL-Verlusts mit WHO-Grad II/III ($p = 0,030$, 2-seitige Signifikanz).

Eine Expression des RAB3B-Proteins fand sich in 18 der 21 analysierten Tumoren. Expressionsdefizite zeigten die Tumoren M17, M13 und M23. Bei M17 und M13 handelte es sich um benigne Meningeome, bei M23 um eine atypische Tumorvariante. Eine Korrelation zwischen Protein-Expressionsverlust und WHO-Grad der Meningeome liess sich statistisch nicht bestätigen ($p > 0,05$). Die Intensität der RAB3B-Expression war im untersuchten Tumorkollektiv sehr variabel, Zusammenhänge mit dem Malignitätsgrad der Tumoren waren nicht zu erkennen.

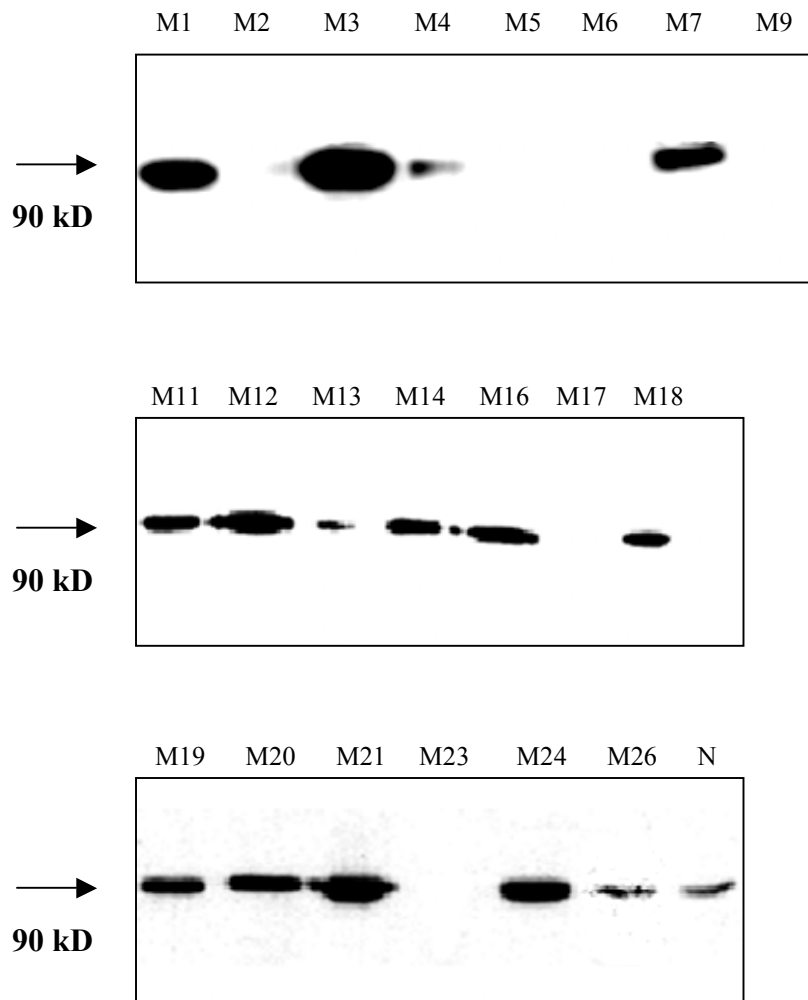


Abbildung 5-6 Western-Blot-Analyse zum Expressionsnachweis des ALPL-Proteins in Meningeomen und meningealem Normalgewebe.

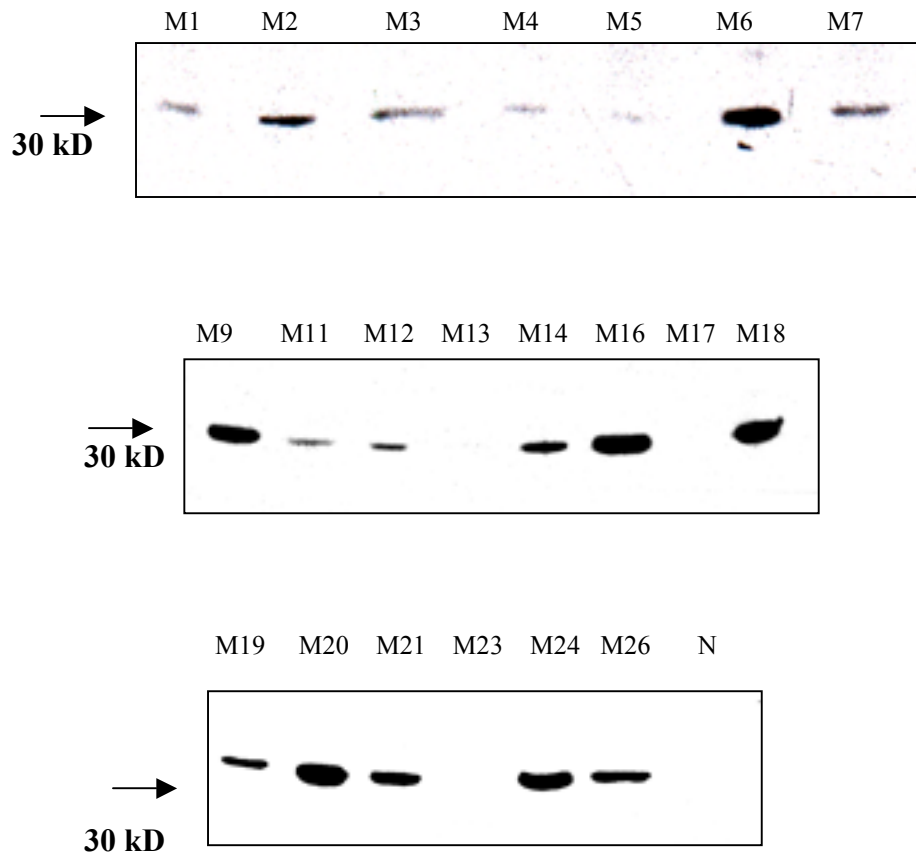


Abbildung 5-7 Western-Blot-Analyse zum Expressionsnachweis des RAB3B-Proteins in Meningeomen und meningealem Normalgewebe.

Tumor	WHO-Grad	ALPL	RAB 3B
M1	I	++	+
M14	I	++	++
M16	I	++	++
M17	I	-	-
M19	I	++	+
M3	I	++	+
M4	I	+	+
M11	I	++	+
M12	I	++	+
M18	I	++	++
M26	I	+	++
M2	I	-	++
M13	I	++	-
M20	I	++	++
M24	I	++	++
M7	II	++	+
M9	II	-	++
M21	II	++	++
M23	II	-	-
M5	III	-	+
M6	III	-	+
N		+	-

Tabelle 5-6 Resultate der Western-Blot-Analysen zum Expressionsnachweis der Proteine ALPL und RAB3B in Meningeomen und meningealem Normalgewebe. Die untersuchten Tumorvarianten sind nach ansteigendem Malignitätsgrad angeordnet.

5.5 Korrelation zwischen Transkription und Proteinexpression

5.5.1 *ALPL*

Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse für das *ALPL*-Gen und die des Expressionsnachweises des ALPL-Proteins wurden in der Tabelle 5-7 einander gegenübergestellt. Die Tumoren sind nach ansteigendem Malignitätsgrad angeordnet.

Im meningealen Normalgewebe und in 17 der 21 Meningeome, von welchen Transkriptionsanalysen und Western-Blot-Analysen vorlagen, fanden sich übereinstimmende Ergebnisse betreffend mRNA-Ebene und Proteinebene.

Interessanterweise zeigten vier Tumoren (M19, M11, M7 und M6) divergente Resultate auf den beiden untersuchten Ebenen. Bei den ersten drei der aufgeführten Tumoren konnte keine mRNA für *ALPL* nachgewiesen werden, obwohl der Proteinnachweis im Western-Blot positiv ausfiel. Tumor M6 wies eine, wenn auch schwache, mRNA Expression des *ALPL*-Locus auf, während kein ALPL-Protein detektiert werden konnte. Diese Ergebnisse bleiben diskussionsbedürftig.

Im Wesentlichen aber bestärken die Ergebnisse des Expressionsnachweises des ALPL-Proteins die auf mRNA-Ebene gefundenen Resultate und unterstützen die Hypothese, daß im Bereich des für *ALPL* kodierenden Gens genomische Veränderungen, wie z.B. Deletionen vorliegen könnten.

Auch die Kumulierung der *ALPL*-Transkriptionsdefizite im Bereich der malignen Tumorvarianten wird durch die Resultate der Proteinexpressionsanalyse unterstrichen.

Dadurch gewinnt der Verlust genomischer Sequenzen in diesem Bereich als molekulargenetischer Prognosefaktor für aggressives Wachstum in Meningeomen an Bedeutung.

Tumor	WHO-Grad	mRNA	Protein
M1	I	++	++
M14	I	++	++
M16	I	++	++
M17	I	-	-
M19	I	-	++
M3	I	++	++
M4	I	+	+
M11	I	-	++
M12	I	++	++
M18	I	+	++
M26	I	++	+
M2	I	-	-
M13	I	++	+
M20	I	++	+
M24	I	++	+
M7	II	-	+
M9	II	-	-
M21	II	++	+
M23	II	-	-
M5	III	-	-
M6	III	+	-
N		++	+

Tabelle 5-7 Vergleich zwischen *ALPL*-Trankriptionsanalyse und Proteinexpressionsanalyse. Die Tumoren sind nach ansteigendem WHO-Grad angeordnet.

5.5.2 *RAB3B*

Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse des *RAB3B*-Gens sind denen des Expressionsnachweises des RAB3B-Proteins in Tabelle 5-8 gegenübergestellt. Die Tumoren sind nach ansteigendem Malignitätsgrad angeordnet.

In 10 der 21 Meningeome, von welchen Transkriptionsanalyse und Protein-Expressionsanalyse vorlagen, stimmten die auf mRNA- und auf Protein-Ebene detektierten Befunde überein. Bei 11 der Tumoren und im Normalgewebe lagen diskrepante Resultate beider analysierter Ebenen vor. Bei acht dieser Meningeome konnte keine *RAB3B*-mRNA nachgewiesen werden, der Proteinnachweis fiel jedoch positiv aus. Nur drei der 11 Tumoren mit differenten Ergebnissen in Transkriptionsanalyse und Western-Blot-Analyse wiesen vorhandene mRNA-Expression, aber Defizite im Proteinnachweis auf, ebenso wie das Normalgewebe. Diese Ergebnisse sind diskussionswürdig und werfen interessante Aspekte hinsichtlich der Ätiologie der Transkriptionsdefizite von Genen auf Chromosom 1p auf.

Tumor	WHO-Grad	mRNA	Protein
M1	I	++	+
M14	I	++	++
M16	I	++	++
M17	I	+	-
M19	I	-	+
M3	I	++	+
M4	I	-	+
M11	I	-	+
M12	I	++	+
M18	I	+	++
M26	I	++	++
M2	I	-	+
M13	I	++	-
M20	I	+	++
M24	I	+	++
M7	II	+	+
M9	II	-	+
M21	II	-	+
M23	II	++	-
M5	III	-	+
M6	III	-	+
N		++	-

Tabelle 5-8 Resultate der Transkriptionsanalyse des *RAB3B*-Gens im Vergleich zu den Ergebnissen der Expressionsanalyse des RAB3B-Proteins. Die untersuchten Meningeome sind nach ansteigendem WHO-Grad angeordnet.

5.6 Mikrosatellitenanalyse

Um Hinweise auf LOH im Bereich des Chromosoms 1p in den mittels mRNA-Expressionsanalyse und Western-Blot untersuchten Tumoren zu erhalten, wurde eine Mikrosatellitenanalyse mit insgesamt 4 Mikrosatelliten-Markern durchgeführt, wovon 3 Marker für 1p und 1 Marker für 1q eingesetzt wurden.

Auf LOH-Untersuchungen in den Tumoren M2, M4, M7, M8, M12, M15, M18, M25 und im meningealen Normalgewebe musste verzichtet werden, da in den aufgeführten Fällen entweder keine Blutprobe zur Kontrolle vorhanden war oder das vorhandene Tumorgewebe nach RNA- und Proteinextraktion mengenmäßig keine DNA-Isolierung mehr erlaubte.

In der abgebildeten Tabelle 5-9 sind die mittels Mikrosatelliten auf LOH 1p untersuchten Tumoren nach steigender Malignität angeordnet. Die drei Mikrosatelliten auf Chromosom 1p sind entsprechend ihrer Lokalisation auf dem Chromosomenarm von telomer nach zentromer angeordnet.

Im Bereich des am weitesten distal lokalisierten Markers AFM078yg5 (1p36) zeigten LOH beide anaplastischen Meningeome und ein benigner Tumor (M20). Von den WHO I und II-Tumoren war dies der einzige nachweisbare Verlust genomischer Sequenzen.

Für den Marker CHLC.GATA27F07 (1p33-p34.2) waren mehrere Tumorproben nicht informativ. LOH liess sich nur für einen der beiden anaplastischen Tumoren nachweisen.

Die Untersuchung mit dem Marker CHLC.GATA72H07 (1p32-p33) ergab in der Mehrzahl der benignen Meningeome wie auch in allen drei atypischen Tumoren einen heterozygoten Status, vier WHO I-Meningeome waren bezüglich des untersuchten Allels nicht informativ. Von den anaplastischen Tumoren zeigte M6 LOH, während M5 sich als nicht informativ erwies.

Bezüglich des Markers CHLC.ATA4D06 (1q31.3-q32.1) waren die WHO I-Tumoren wie auch die WHO II-Tumoren zum größten Teil heterozygot. Jeweils ein benigner Tumor (M17) wie ein atypischer (M9) zeigten sich homozygot im Bereich des untersuchten Allels. Beide untersuchten anaplastischen Meningeome (M5 und M6) wiesen LOH im Bereich dieses Markers auf.

WHO-Grad	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II	II	II	III	III
	M 1	M 3	M 11	M 13	M 14	M 16	M 17	M 19	M 20	M 22	M 24	M 26	M 9	M 21	M 23	M 5	M 6
Mikrosatelliten-Marker																	
AFM078yg5 1p36	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○	○	●	●
CHLC.GATA27F07 1p33-34.2	○	○	○	○	○	-	-	-	○	-	-	○	-	○	-	●	-
CHLC.GATA72H07 1p32-p33	○	-	○	○	-	-	○	○	-	○	○	○	○	○	○	-	●
CHLC.ATA4D06 1q31.3-q32.1	○	○	○	○	○	○	-	○	○	○	○	○	-	○	○	●	●

Tabelle 5-9 Die mittels Mikrosatelliten auf LOH 1p untersuchten Tumoren sind nach Malignitätsgrad angeordnet. ○ bedeutet Heterozygotität des analysierten Allels, ● steht für LOH des untersuchten Allels, - bedeutet nicht informativ bezüglich des untersuchten Allels.

Bei den beiden untersuchten WHO III-Tumoren lässt die Mikrosatellitenanalyse auf den Verlust eines ganzen Chromosoms 1 schliessen, da die eingesetzten Marker einen großen Bereich des Chromosoms abdecken und durchgängig LOH für die entsprechenden Genloci ergaben. Der Vergleich der Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse mit den Ergebnissen der Expressionsanalyse zeigt für die Gruppe der anaplastischen Tumorvarianten eine eindeutige positive Korrelation.

Die übrigen Tumoren der WHO-Grade I und II zeigten - mit Ausnahme eines benignen Meningeoms - keinen Verlust der Heterozygotität, obwohl auf der mRNA-Ebene bei den atypischen und auch bei den benignen Tumoren deutliche Expressionsdefizite nachweisbar waren. Diese Diskrepanz bleibt diskussionsbedürftig.

5.7 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung

Um die Ergebnisse der molekulargenetischen Analysen mit einer Methode zu überprüfen, die der praktisch-diagnostischen Tätigkeit leichter zugänglich ist, wurde für das Protein ALPL an einem unabhängigen Tumorkollektiv mit einem monoklonalen Antikörper eine immunhistochemische Untersuchung durchgeführt.

Eine positive Reaktion zeigte sich in einer mehr oder weniger ausgeprägten Braunfärbung des Zytoplasmas der Tumorzellen. Eine deutliche Anfärbung zeigten in allen Tumoren die Gefäßendothelien. Diese Reaktion wurde als interne Positivkontrolle gewertet.

Von den als WHO-Grad I klassifizierten Meningeomen ($n = 46$) zeigten die meisten Tumoren eine positive ALPL-Färbereaktion (PP) praktisch aller Zellen. Einige wenige WHO I-Tumorvarianten (6 von 46) wiesen einen deutlich geringeren Prozentsatz ALPL-positiver Zellen ($<50\%$) auf. In einem der WHO-I Meningeome fehlte jegliche Färbereaktion ausgenommen im Bereich von Blutgefäßen. Die Färbeintensität (SI) variierte allerdings deutlich zwischen den einzelnen Meningeomen.

In der Gruppe der atypischen Meningeome ($n = 6$) war die Färbereaktion weniger einheitlich. Während ein Tumor keine ALPL-Reaktion zeigte, wiesen die übrigen in mehr oder weniger großen Arealen eine fehlende Färbereaktion auf.

Unter den analysierten anaplastischen Tumorvarianten ($n = 6$) ließen sich in vier Tumoren nur weniger als 10% der Zellen anfärben, in den beiden anderen fehlte die ALPL-Färbereaktion in mehr als 50% der Zellen.

Die bereits aus dem Prozentsatz der angefärbten Zellen erkennbare Tendenz eines progressionsassoziiert zunehmenden Verlustes der ALPL-Färbereaktion spiegelt sich deutlich im Remmele-Score (IRS) wider: Der IRS-Mittelwert beträgt in der Gruppe der WHO-I Tumoren 7,2, bei den atypischen Meningeomen 4,0, bei den anaplastischen Tumorvarianten 2,3.

Somit bestätigt die immunhistochemische Untersuchung an einem unabhängigen Tumorkollektiv den in Transkriptionsanalyse und Westerblot nachgewiesenen ALPL-Verlust bei atypischen und anaplastischen Meningeomen.

Tumor	WHO-Grad	PP	SI	IRS
1	I	4	1-2	8
2	I	4	1-2	8
3	I	4	2-3	12
4	I	1	1	1
5	I	4	2	8
6	I	4	2	8
7	I	1-2	3	6
8	I	2	2	4
9	I	3	3	9
10	I	4	1	4
11	I	4	1	4
12	I	4	3	12
13	I	4	1	4
14	I	3	2	6
15	I	3	1	3
16	I	4	1	4
17	I	4	3	12
18	I	4	2	8
19	I	3	2	6
20	I	4	1-2	8
21	I	3	3	9
22	I	3	2	6
23	I	4	2	8
24	I	3	1	3
25	I	4	2	8
26	I	4	3	12
27	I	2	2	4
28	I	4	2	8
29	I	1	2	2
30	I	4	1	4
31	I	4	2	8
32	I	2	2	4
33	I	3	3	9
34	I	3	2	4
35	I	4	3	12
36	I	0	0	0
37	I	3	1-2	6
38	I	4	2	8
39	I	3	1-2	6

Tumor	WHO-Grad	PP	SI	IRS
40	I	4	3	12
41	I	4	3	12
42	I	4	3	12
43	I	4	3	12
44	I	4	3	12
45	I	4	1	4
46	I	4	2	8
47	II	0	0	0
48	II	3	1	3
49	II	2	1	2
50	II	3	2	6
51	II	4	1	4
52	II	3	3	9
53	III	2	3	6
54	III	1	1	1
55	III	0	0	0
56	III	2	2	4
57	III	1	1	1
58	III	1	2	2

Tabelle 5-10 Prozentsatz positiver Zellen (PP), Färbeintensität (SI) und Remmele-Score (IRS) der immunhistochemisch analysierten Tumoren. Die Tumoren sind in der Tabelle nach ansteigendem WHO-Grad angeordnet.

6 DISKUSSION

Die in der Regel günstige Prognose der Meningeomkrankung wird begrenzt durch einen kleinen Anteil von Tumoren mit aggressivem Wachstum und von einer überraschend hohen Rezidivhäufigkeit sogar benigner Tumorvarianten. Dieses Problem hat in den letzten Jahren die Suche nach prädiktiven Faktoren für das Wachstumsverhalten von Meningeomen intensiviert. Histopathologische Prognosefaktoren konnten trotz mehrfacher Revision der WHO-Klassifikation in den letzten Jahren nur unzureichend etabliert werden, sodass zusätzliche molekulargenetische Untersuchungen empfohlen werden (Louis et al., 2000).

Progressionsassoziierte genomische Instabilität ist bei einer Vielzahl humaner Malignome bekannt. Für Meningeome scheint der Verlust genomischer Sequenzen auf Chromosom 1p gut mit Malignitätsgrad und Rezidivrate zu korrelieren (Weber et al., 1997, Sulman et al., 1998, Leone et al., 1999, Bello et al., 2000). In dieser chromosomalen Region konnten bereits in andere humane Neoplasien involvierte Tumorsuppressorgene (TSG) lokalisiert werden, weitere bisher nicht charakterisierte TSGs in diesem Bereich werden vermutet. In Meningeomen konnte bisher kein sicheres Zielgen der progressionsassoziierten 1p-Deletionen identifiziert werden.

Ziel dieser Studie war, eine Expressionskarte 1p-spezifischer Transkripte zu erstellen, um damit die Zielregion der 1p-Deletion näher einzugrenzen, mögliche Zielgene zu charakterisieren und die Korrelation der gefundenen Veränderungen mit dem WHO-Grad der Tumoren zu überprüfen.

6.1 Übersicht über die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse 1p-spezifischer Transkripte

Die mRNA-Expression für 13 1p-spezifische und zwei 1q-spezifische Loci wurde mittels RT-PCR in 25 humanen Meningeomen der WHO-Grade I-III analysiert. Transkriptionsdefizite kumulierten im Bereich der Gene *ALPL*, *GADD45* und *RAB3B*. Somit konnten Zielbereiche der Veränderungen auf 1p, aber kein einzelnes Zielgen definiert werden. Die deutliche Konzentration der Transkriptionsdefizite in der Gruppe der malignen Tumorvarianten bestätigt die von anderen Autoren (Bello et al., 1994, Weber et al., 1997, Ishino et al., 1998, Sulman et al., 1998, Müller et al., 1999)

beschriebene Progressionsassoziation der 1p-Alterationen in Meningeomen.

Zur Überprüfung der DNA-Ebene wurde eine Mikrosatelliten-Analyse mit drei im Bereich gehäufte Transkriptionsdefizite lokalisierter Marker durchgeführt. Ein zusätzlicher Marker auf 1q wurde eingesetzt, um Hinweise auf den vollständigen Verlust eines Chromosom 1 zu erhalten. Die untersuchten WHO-III-Tumoren zeigten LOH für alle analysierten Marker. Dies war als Indiz für eine Monosomie 1 zu werten. Die untersuchten atypischen Tumoren zeigten keinen Verlust der Heterozygotität, obwohl Transkriptionsdefizite detektabel waren. Möglicherweise handelt es sich hier um interstitielle Verluste, die mit dem verwendeten Mikrosatellitenraster nicht erfasst wurden. Dieser Befund könnte aber auch dafür sprechen, dass neben dem Verlust genomischer Sequenzen auch andere Mechanismen zur Inaktivierung beider Allele eines Gens führen können.

Für die Gene *ALPL* und *RAB3B* wurden die mRNA-Expressionsdefizite auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analyse überprüft. Die *ALPL*-Expression zeigte gute Korrelation mit der Transkriptionsanalyse, sodass die Hypothese genomischer Veränderungen des für *ALPL* kodierenden Gens mit Tumorprogression unterstützt wurde. Der in der Literatur berichtete *ALPL*-Verlust mit zunehmendem Malignitätsgrad (Niedermayer et al., 1997, Müller et al., 1999) konnte durch diese Studie bestätigt werden. Dagegen zeigte die Proteinexpressionsanalyse für *RAB3B* teilweise diskrepante Ergebnisse, die auf komplexe Regulationsmechanismen hinweisen könnten. Immunhistochemisch fand sich in Übereinstimmung mit anderen Autoren (Niedermayer et al., 1997, Müller et al., 1999) ein teilweiser oder vollständiger Verlust der *ALPL*-Aktivität in atypischen und anaplastischen Tumorvarianten. Somit konnte *ALPL*-Aktivität als leicht zu untersuchender histochemischer Progressionsmarker (Niedermayer et al., 1997) bestätigt werden.

Zusammenfassend konnte die Bedeutung von 1p-Alterationen als prädiktiver Faktor für das Wachstumsverhalten von Meningeomen durch die Ergebnisse dieser Studie unterstützt werden.

6.2 Charakterisierung der einzelnen Loci und ihrer Bedeutung für Meningeomentwicklung und -progression

6.2.1 Loci auf 1q

Als Kontrolle wurde die Expressionsanalyse zweier 1q-spezifischer Gene in die Untersuchung einbezogen, um isolierte 1p-Deletionen von größeren Stückverlusten oder dem vollständigem Verlust eines Chromosoms 1 abgrenzen zu können.

6.2.1.1 *IL-6r*

Das Gen für den Interleukin-6-Rezeptor (*IL-6r*) wurde mittels FISH auf 1q21 lokalisiert (Kluck et al., 1993). Bei IL-6 handelt es sich um ein multifunktionelles Zytokin, involviert in Regulierung der Immunantwort, Hämatopoese und Akute-Phase-Reaktion (Horn et al., 2000, Hirano et al., 2000, Jones et al., 2001). Der Rezeptor setzt sich aus einer 80kD großen IL-6 bindenden Untereinheit (IL-6rA) und gp 130 zusammen. Einen Effektorsignalweg downstream des IL-6R stellt der STAT-Signalweg, allen voran der Transkriptionsfaktor STAT3 dar (Horn et al., 2000). IL-6 und sein Rezeptor spielen in der Pathogenese zahlreicher humaner Neoplasien wie z.B. dem Multiplen Myelom (Gado et al., 2000, Lauta, 2001, Barille et al., 2000), dem Nierenzell-Karzinom (Paule, 2001) und dem Prostata-Karzinom (Smith et al., 2001) eine bedeutende Rolle, indem sie die Apoptose maligner Zellen verhindern.

In der vorliegenden Studie konnte im Arachnothel sowie in der Mehrzahl der analysierten Tumoren ein *IL-6r*-Transkript detektiert werden. Unter den fünf Tumoren mit defizitärer Expression befanden sich alle malignen Tumorvarianten. Interessanterweise war die *IL-6r*-Expression in den atypischen Tumoren schwächer als in den benignen. Bei diesem progressionsassoziierten Expressionsverlust könnte es sich einfach um die Folge zunehmender genomischer Instabilität handeln, ohne dass der Verlust dieses Gens selbst in das Tumorstadium involviert wäre. Die Expressionsbefunde könnten aber auch auf eine mögliche Tumorsuppressorfunktion des *IL-6r*-Gens in Meningeomen hinweisen. Die zusätzlich durchgeführte Mikrosatellitenanalyse spricht in den malignen Tumorvarianten M5 und M6 für einen

ausgedehnten Stückverlust eines Chromosom 1 mit einer Bruchstelle auf 1q distal des Markers CHLC.ATA4D06 (1q31.3-q32.1). Der schwächeren *IL-6r*-Expression in den atypischen Meningeomen steht auf DNA-Ebene kein LOH gegenüber, sodass hier vermutlich andere Mechanismen die reduzierte Expression bedingen.

6.2.1.2 *TRK*

Das *TRK*-Protoonkogen kodiert für eine zytoplasmatische Proteintyrosinkinase, die einem trunkierten NGF-Rezeptor entspricht (Martin-Zanca et al., 1989, Hempstead et al., 1991, Kaplan et al., 1991). Seine chromosomale Lokalisation ist 1q23-q24 (Morris et al., 1991). In Kolon-Karzinomen (Martin-Zanca et al., 1989) und in papillären Schilddrüsenkarzinomen (Greco et al., 1992) wurden Fusionsgene gefunden, die durch Rekombination von *TRK* mit anderen Genen entstanden sind.

Im meningealen Normalgewebe und in allen Tumoren mit Ausnahme eines anaplastischen Meningeoms konnte eine starke *TRK*-Expression nachgewiesen werden. Expression eines Protoonkogens im Tumorgewebe ist nicht unbedingt mit dessen Aktivierung gleichzusetzen. Die Frage einer Aktivierung könnte nur durch eine gezielte Mutationsanalyse dieses Gens geklärt werden. Somit kann im Rahmen dieser Studie eine Tumorsuppressorfunktion von *TRK* nicht unterstützt werden, zur Frage einer onkogenen Wirkung ist keine Aussage möglich.

6.2.2 *Gene auf 1p mit fehlender zelltypisch konstitutiver Expression und fehlender tumorspezifischer Expression*

6.2.2.1 *FGR*

Bei *FGR* handelt es sich um ein humanes Homolog des „Gardner-Rasheed feline viral oncogene“, das auf 1p36.2-p36.1 lokalisiert wurde (Tronick et al., 1985). Das *FGR*-Protoonkogen, das früher als *SRC2* bezeichnet wurde, gehört zur Familie der *SRC*-Protoonkogene und hat selbst Tyrosinkinase-Eigenschaften (Tronick et al., 1985). Obwohl *FGR* hauptsächlich in Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert wird,

war es in dieser Studie wegen seiner genomischen Nähe zu *ALPL* von Interesse. Eine Aktivierung des Protoonkogens in EBV-assoziierten Lymphomen ist bekannt (Cheah et al., 1986).

Im untersuchten Tumorkollektiv liessen sich bis auf zwei Ausnahmen keine *FGR*-Transkripte nachweisen. Die schwache Detektion vom mRNA im Arachnothel wie auch in zwei Tumoren ist wahrscheinlich auf eine Verunreinigung dieser Proben mit Blut zurückzuführen. Die fehlende Expression des *FGR*-Protoonkogens schliesst im Prinzip eine onkogene Funktion dieses Gens in Meningeomen aus.

6.2.2.2 *CD 30*

Der Genort des Lymphozyten-Aktivierungs-Antigens CD30, auch Ki-1 genannt, wurde auf 1p36 lokalisiert (Fonatsch et al., 1992). CD30 wird auf aktivierten B- und T-Zellen exprimiert, hemmt die Proliferation autoreaktiver CD8 Zellen und schützt dadurch vor Autoimmunerkrankungen (Kurts et al., 1999). Beim M. Hodkin wie auch bei verschiedenen Non-Hodkin-Lymphomen ist eine Expression von CD30 auf den Tumorzellen bekannt (Salhany et al., 1991, Fonatsch et al., 1992).

Die in dieser Studie untersuchten Meningeome wie auch das meningeale Normalgewebe zeigten keine Expression von *CD30*-Transkripten. Somit spielt CD30 offensichtlich in Meningeomen keine Rolle.

6.2.2.3 *OPRD1*

Das *OPRD1*-Gen konnte auf dem kurzen Arm des humanen Chromosom 1 (1p36.1-34.3) mittels FISH-Analyse lokalisiert werden (Befort et al., 1994). Es kodiert für den δ -Opioidrezeptor, der in normalen und malignen Pigmentzellen und in Nervenzellen exprimiert wird und bei der Vermittlung der biologischen Funktion der Opioiden eine bedeutende Rolle spielt. Mayer et al. (2000) konnten zeigen, dass humane Melanome einen alterierten δ -Opioidrezeptor aufweisen, dem kein Defekt auf DNA-Ebene, sondern eine fehlerhafte mRNA-Prozessierung zugrunde liegt. Es resultiert ein verkürztes Rezeptorprotein, dem die dritte zytoplasmatische Domäne fehlt.

In der vorliegenden Studie konnte das Transkript für *OPRD1* weder in den Tumoren noch im meningealen Normalgewebe gefunden werden. Eine Involvierung in die Tumorigenese humaner Meningeome ist aufgrund der fehlenden Expression nicht anzunehmen.

6.2.2.4 *NGFβ*

Während ältere Studien das Gen für die β -Untereinheit des „nerve-growth-factor“ (*NGFβ*) in der Region 1p22 vermuten (Franke et al., 1983, Zabel et al., 1985), wird es in neueren Studien in die Region 1p13 lokalisiert (Mitchell et al., 1995). Große Bedeutung hat NGF, ein Mitglied der Familie der Neurotrophine, in der Regulation von Wachstum und Differenzierung sympathischer und sensorischer Neurone (Levi-Moltacini, 1987). Eine Involvierung in Krankheiten und Tumoren des Nervensystems wie familiäre Dysautonomie, Neurofibromatose, intestinale Ganglioneuromatose und Neuroblastom wird vermutet (Zabel et al., 1985).

Ein Transkript für *NGFβ* konnte weder im meningealen Normalgewebe noch in der Mehrzahl der untersuchten Tumoren mit Ausnahme dreier benignen Meningeome gefunden werden. Eine Involvierung in Genese und Progression humaner Meningeome ist somit nicht anzunehmen.

6.2.3 *Exprimierte Gene ohne Verdacht auf Involvierung in Meningeomwachstum*

6.2.3.1 *TNF-R2*

Das für den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-2 kodierende Gen *TNF-R2* liegt auf Chromosom 1p36.3-p36.2 (Beltinger et al., 1996). Bei *TNF-R2* handelt es sich um den größeren der beiden Rezeptoren für *TNF-α*. *TNF-α*, einer der wichtigsten Liganden des *TNF-R2*, ist ein multifunktionelles Zytokin, das eine wichtige Rolle in Immun- und Entzündungsreaktion spielt. Aber auch in Prozesse wie Kontrolle der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose von Tumorzellen ist *TNF-α* involviert (Baud und Karin 2001). *TNF-R2* vermittelt die regulierende *TNF-α* Wirkung in der Proliferation von

Thymozyten, peripheren Blutzellen, tumorinfiltrierenden Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen. Auch an der Autoregulation der Apoptose in $CD8^+$ -T-Zellen ist *TNF-R2* maßgeblich beteiligt (Zheng et al., 1995).

Gesundes Arachnothel und alle untersuchten Tumoren zeigten Transkripte von *TNF-R2*. Da Homologien zwischen *TNF-R2* und *TNF-R1* bekannt sind (Beltinger et al., 1996), kann eine Mitamplifizierung des auf Chromosom 12p13.2 lokalisierten *TNF-R1*-Gen nicht sicher ausgeschlossen werden. Wenn man diese Möglichkeit außer Acht lässt, muss man aufgrund der Ergebnisse von mindestens einem funktionstüchtigen *TNF-R2*-Allel ausgehen. Bei der Mikrosatellitenanalyse ergab sich für drei Tumoren, davon 2 WHO Grad III-Meningeome, LOH für einen Marker (AFM078yg5), der im Bereich 1p36 lokalisiert ist. Daraus lässt sich ableiten, dass auch in diesen Fällen, in denen möglicherweise ein Stückverlust des Chromosom 1p vorliegt, das zweite Allel nicht alteriert ist. Eine Involvierung von *TNF-R2* in Tumorentwicklung und Progression bei Meningeomen scheint unwahrscheinlich.

6.2.3.2 *PRKACB*

Das für die katalytische β -Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase kodierende Gen *PRKACB* wurde auf Chromosom 1p36.1 lokalisiert (Berube et al., 1991, Simard et al., 1992). Über eine Involvierung von *PRKACB* in die Entstehung oder Progression humaner Neoplasien ist bis heute nichts bekannt.

Im meningealen Normalgewebe wie auch im analysierten Tumorkollektiv war das *PRKACB*-Transkript in allen Fällen mit Ausnahme zweier Meningeome detektabel. Bei den zwei Tumoren mit defizitärer *PRKACB*-Expression handelt es sich um ein benignes und ein malignes Meningeom. Eine Involvierung in die Tumorigenese scheint aufgrund dieser Ergebnisse nicht wahrscheinlich.

6.2.3.3 *JAK1*

Die kodierende Sequenz für JAK1 liegt auf Chromosom 1p31.3 (Modi et al., 1995). JAK1 ist ein Mitglied der Familie der Janus-Kinasen (JAKs). Bei den JAKs handelt es

sich um Nicht-Rezeptor-Thyrosin-Kinasen, deren wesentliche Bedeutung in der Signalübertragung durch Zytokinrezeptoren liegt. Die aktivierten JAKs bewirken eine Phosphorylierung einer Gruppe von Proteinen, die als STATs („signal transducer and activator of transcription“) bezeichnet werden. Diese lagern sich zu Dimeren zusammen, translozieren in den Zellkern und binden an Erkennungssequenzen der DNA zur Regulierung der Genexpression (Ihle, 1995, Aaronsson et al., 2002).

JAK1 ist ubiquitär vorhanden und hat vorrangig Bedeutung in der Signaltransduktion von Klasse II Zytokinrezeptoren, hauptsächlich Rezeptoren für Interferon α , β und γ (Rodig et al., 1998, Aringer et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von Interferon- α -2b zu Meningeomzellkulturen eine Phosphorylierung von STAT 1 und STAT 3 erfolgt (Magrassi et al., 1999). Umgekehrt konnte ein mangelndes Ansprechen von *JAK1* defizienten Tumorzelllinien (*JAK1*^{-/-}) auf eine Interferontherapie nachgewiesen werden (Müller et al., 1993).

Eine Involvierung in Tumorigenese und Progression humaner Tumore konnte bisher für *JAK1* nicht ermittelt werden.

In der vorliegenden Studie waren *JAK1*-Transkripte im meningealen Normalgewebe und in den untersuchten Tumoren mit Ausnahme von drei Meningeomen detektabel. Auffallend war, dass die Expression im Arachnothel deutlich schwächer war als in der Mehrzahl der Tumoren. Zum gleichen Ergebnis kamen Magrassi et al. (1999) in einer Studie an 17 benignen Meningeomen. In der vorliegenden Untersuchung dominierte in WHO I und II Tumoren starke *JAK1*-Expression, während die anaplastischen Meningeome eine deutlich schwächere *JAK1*-Expression aufwiesen. Dieser Befund könnte auf eine verstärkte Transkription oder Amplifikation von *JAK1* und damit auf eine verstärkte Aktivierung des Signalweges in benignen Tumorvarianten hinweisen. Es könnte sich aber auch um eine Supprimierung der *JAK1*-Transkription in den malignen Tumoren handeln. Zur Klärung der Frage, welche dieser beiden Hypothesen zutreffend ist, würde eine Untersuchung der phosphorylierten STATs beitragen. Die detektierten Unterschiede in der Intensität der *JAK1*-Expression könnten als Erklärung für das schlechtere Ansprechen maligner Meningeome auf eine Interferontherapie dienen. Eine eindeutige Wirkung auf Meningeomentwicklung und Progression kann aus der vorliegenden Studie nicht abgeleitet werden.

6.2.3.4 *cJUN*

cJUN repräsentiert das humane Homolog des Avian-Sarcoma-Virus 17-Onkogens (*v-JUN*). Die chromosomale Lokalisation von *cJUN* ist 1p32-p31 (Haluska et al., 1988, Hattori et al., 1988), eine Region, die häufig im Sinne von Deletionen und Translokationen in die Entwicklung humaner Malignome involviert ist. Schon frühzeitig war die Funktion von *cJUN* als AP-1 ähnlicher oder sogar identischer Transkriptionsfaktor bekannt (Haluska et al., 1988, Hattori et al., 1988). *c-JUN* gehört zu den sog. „immediate early genes“, die nach Wachstumsstimulation der Zelle zuerst exprimiert werden und Wachstum, Differenzierung und Transformation beeinflussen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass nach UV-Bestrahlung die Induktion des Protoonkogens *cJUN* für den Wiedereintritt der Zelle in den Zellzyklus verantwortlich ist (Shaulian et al., 2000).

In dieser Studie konnte in allen analysierten Tumoren wie auch im meningealen Normalgewebe ein *cJUN*-Transkript detektiert werden. Die Stärke der Expression war unterschiedlich, wies aber keine Korrelation mit dem Malignitätsgrad der Meningeome auf. Die Expression in allen untersuchten Tumoren lässt nicht auf eine genomische Deletion im Bereich dieses Gens rückschließen. Über eine verstärkte Aktivierung im Sinne einer onkogenen Funktion in Meningeomen ist keine Aussage möglich.

6.2.3.5 *NRAS*

N-RAS wurde primär in Neuroblastomen detektiert und auf Chromosom 1p13.2 lokalisiert (Rabin et al., 1984, Mitchell et al., 1995). Es handelt sich um ein Mitglied der *RAS*-Onkogenfamilie, die zelluläre Homologe retroviraler Onkogene darstellen. *RAS*-Proteine spielen in der Signalübertragung von Tyrosinkinasen durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren eine bedeutende Rolle. Die *RAS*-Gene gehören zu den in soliden und auch hämatopoetischen humanen Tumoren am häufigsten mutierten Genen. Bei den Mutationen handelt es sich ausschliesslich um aktivierende Punktmutationen, die Kodon 12, 13 oder 61 betreffen und transformierendes Potential haben. Der durch die Punktmutation bedingte Aminosäureaustausch führt in dem primär zur GTP-Bindung und Hydrolyse befähigten *RAS*-Protein zum Verlust der GTPase-Aktivität.

Damit verbleibt das Protein in seiner aktiven Form. Onkogene RAS-Mutanten führen durch ihre konstitutive GTP-Bindung zu Reaktionen, die der physiologischen Antwort auf Wachstums- und Differenzierungsfaktoren gleichen, wie Hochregulierung der mRNA-Expression früher Antwortgene wie *FOS* und *c-MYK* und DNA-Synthese (Lloyd et al., 1989, Stacey et al., 1987). Zusätzlich werden durch RAS-Onkoproteine typische Effekte transformierter Zellen wie Verlust der Kontaktinhibition, substratunabhängiges Wachstum und Kräuselung der Zellmembran induziert (Bar-Sagi und Feramisco et al., 1986). In neuesten Studien wird *N-RAS* neben *K-RAS* eine besondere Rolle als frühe Veränderung in der Genese Multipler Myelome und primärer Plasmazellleukämien zugeschrieben (Bezieau et al., 2001).

In der vorliegenden Studie konnte in allen Tumoren mit Ausnahme von M11 und M15 wie auch im meningealen Normalgewebe eine starke Expression des *N-RAS*-Transkriptes detektiert werden. Die konstante Expression impliziert nicht die Aktivierung des *NRAS*-Protoonkogens zum Onkogen, möglicherweise spiegelt die detektable *NRAS*-Expression nur den physiologischen Zustand wider. Da die bisher in den RAS-Genen gefundenen Mutationen ausschließlich Punktmutationen sind, können sie mit einer Expressionsanalyse nicht erfasst werden, es sei denn, die Punktmutation läge in der Hybridisierungssequenz des Primers. Um eine Involvierung in die Meningeomentwicklung und Progression durch eine aktivierende Punktmutation von *NRAS* nachzuweisen, müssten Mutationsanalysen durchgeführt werden. Grundsätzlich muß auch diskutiert werden, ob die konstant vorliegende Expression möglicherweise auf eine zusätzliche Amplifikation homologer genomischer Sequenzen von *H-RAS* und *K-RAS* zurückzuführen ist.

6.2.4 Bedeutung des Expressionsmusters von *SKI*

Als Genlokus von *SKI*, dem Homolog des „avian sarcoma viral oncogene“ (*v-SKI*), wurde bis vor kurzer Zeit Chromosom 1q22-q24 angenommen (Chaganti et al., 1986). Aufgrund von Ähnlichkeiten des *SKI*^{-/-} Phänotyps mit dem des 1p-Deletionssyndroms (Shapira et al., 1997, Slavotinek et al., 1999) wurde die chromosomale Lokalisation von *SKI* überprüft und auf 1p36.3 in unmittelbarer Nachbarschaft des diskutierten TSG *p73* detektiert (Shinagawa et al., 2001, Colmenares et al., 2002). *SKI* ist als ein Effektor des TGFβ1-Signalweges bekannt. *SKI*-Überexpression macht die Zellen resistent gegenüber

dem wachstumsinhibierenden Effekt von TGF β 1 (Sun et al., 1999). Diese Ergebnisse sind gut vereinbar mit einer Funktion von *SKI* als Onkogen. Im Gegensatz dazu berichten andere Autoren über eine erhöhte Proliferationskapazität *SKI*-defizienter muriner Fibroblasten und über eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Tumorentwicklung in Mäusen mit Heterozygotie des *SKI*-Allels (Shinagawa et al., 2001). *SKI* scheint folglich auch eine Tumorsuppressorfunktion einnehmen zu können.

In der vorliegenden Studie wurde im Arachnothel kein *SKI*-Transkript entdeckt, sodass man unter physiologischen Bedingungen von einer fehlenden konstitutiven Expression ausgehen muss. Fehlende Expression fand sich auch in etwa 2/3 der untersuchten Tumoren, während interessanterweise ein Drittel eine schwache bis starke Expression aufwies. Auffällig war, dass sich unter den malignen Tumorvarianten ein verhältnismäßig größerer Anteil *SKI*-negativer Meningeome (5/7) als unter den benignen (11/18) fand. Vorstellbar wäre, dass eine primäre Aktivierung des *SKI*-Gens zur Meningeomentwicklung beiträgt. Eine sekundäre Deletion des Gens könnte im Sinne der von Shinagawa et al. (2001) postulierten Tumorsuppressorfunktion in die Meningeomprogression involviert sein.

6.2.5 Zielgene der 1p-Deletionen in Meningeomen

6.2.5.1 GADD45

Das „growth arrest and DNA damage-inducible gene“ (*GADD 45*) konnte auf Chromosom 1p34-p12 lokalisiert werden (Papathanasiou et al., 1991). *GADD 45* ist ein Kernprotein, das in einer Vielzahl verschiedener Zellen exprimiert wird (Carrier et al., 1994, Kearsey et al., 1995) und an der Regulation der Exzisionsreparatur der DNA nach genotoxischem Stress mitwirkt (Smith et al., 1994). Es konnte nachgewiesen werden, dass *GADD45* einen Kontrollpunkt am Übergang von der G2-Phase zur Mitose-Phase des Zellzyklus induziert (Wang et al., 1999, Tran et al., 2002). Wang et al. (1999) postulieren die Abhängigkeit der *GADD45*-Wirkung von der Anwesenheit von Wildtyp-p53, da p53-defiziente Li-Fraumeni-Fibroblasten nach *GADD45*-Mikroinjektion keinen Zellzyklusarrest zeigten. Die Autoren konnten darüber hinaus zeigen, dass sich *GADD45*-defiziente Zellen nach Bestrahlung keinem Zellzyklusarrest

unterzogen. Weitere Studien demonstrierten in GADD45-defizienten Mäusen einen der p53-Defizienz ähnlichen Phänotyp mit genomischer Instabilität und erhöhter Tumorigenese nach Bestrahlung (Hollander et al., 1999).

In der vorliegenden Studie konnte ein progressionsassoziiertes Verlust des *GADD45*-Transkriptes detektiert werden. Aufgrund der bekannten GADD45-Wirkung im Zellzyklus wäre es durchaus vorstellbar, dass GADD45-Verlust in meningealen Tumoren zur malignen Transformation beiträgt. Da in atypischen/anaplastischen Tumorvarianten häufiger *GADD45*-Verlust nachgewiesen wurde, muß wie bei *ALPL*-Verlust eine Involvierung insbesondere in die Tumprogression in Betracht gezogen werden. *GADD45* könnte somit nach der Datenlage dieser Studie als TSG in Meningeomen funktionieren.

6.2.5.2 RAB3B

Das RAS-assoziierte Protein RAB3B gehört der RAS-Protein-Superfamilie an. Seine genomische Lokalisation wurde durch in-situ-Hybridisierung auf 1p32-p31 detektiert (Rousseau-Merck et al., 1991). Bei den RAB-Proteinen handelt sich um den primären RAS-Proteinen (K-RAS, H-RAS, N-RAS) strukturell und biochemisch verwandte GTP-bindende und -hydrolysierende Proteine. Deren Funktion ist die Kontrolle diverser essentieller Zellfunktionen wie Wachstum, Differenzierung, Organisation des Zytoskeletts, intrazellulärer Vesikeltransport und Sekretion (Bourne et al., 1990, Bourne et al., 1991, Downward, 1990, Hall, 1990). Die RAB-Proteine zeigen untereinander Homologien von 30-50% (Zahraoui et al., 1989), andere Autoren sprechen sogar von 70% Homologien in der Aminosäuresequenz zwischen RAB3B und RAB3A. Die Homologien mit p21^{RAS}, dem Produkt der *RAS*-Onkogene, betragen circa 30% und sind auf die vier GTP-bindenden Domänen beschränkt (Zahroui et al., 1989).

RAB3B kommt membranassoziiert an Stellen der intrazellulären Kommunikation vor und ist nach neuesten Studien neben seiner regulatorischen Beteiligung an Vesikeltransport und Sekretion an deren Regulation beteiligt (Lin et al., 1997, Sunshine et al., 2000, Piiper et al., 2001). Bisher ist eine Involvierung des *RAB3B*-Genes in die Genese humaner Tumoren nicht bekannt. Grundsätzlich wäre aber bei den bekannten Homologien mit dem RAS-Protein eine ähnliche onkogene Funktion bei Aktivierung denkbar. Da die Beteiligung von RAB3B an der Regulation von interzellulären

Kontaktmolekülen bekannt ist (Sunshine et al., 2001), könnte ein vollständiger Expressionsverlust dieses Genes aber auch im Sinne einer Tumorsuppressorfunktion unkontrolliertes Zellwachstum mit Infiltration des umgebenden Gewebes zur Folge haben, ähnlich den Mechanismen, die bei Verlust von Zelladhäsionsmolekülen wie Integrinen und Cadherinen zur Invasion führen (Schwechheimer et al., 1998).

In der vorliegenden Studie zeigte sich ein progressionsassoziierter Verlust des *RAB3B*-Transkriptes. Interessanterweise gelang aber in allen Tumoren mit defizitärer mRNA-Expression ein schwacher Proteinnachweis. Umgekehrt konnte im Normalgewebe und in einigen Tumorvarianten trotz starker mRNA-Expression kein Protein nachgewiesen werden.

Der im Normalgewebe und bei drei Tumoren unterschiedlicher WHO-Grade fehlende Proteinnachweis bei starker mRNA-Expression könnte auf Prozessierungsfehler der mRNA oder auf eine fehlerhafte Translation zurückzuführen sein. Die auffallende Häufung eines schwachen Proteinnachweises bei fehlender mRNA-Detektion könnte für ein stabiles Protein mit niedrigem Turnover und sekundärer Supprimierung der Transkription sprechen. In diesen Fällen wäre allerdings die Aussagekraft der Expressionsanalyse als Hinweis auf genomische Deletionen in Frage zu stellen.

Die Hypothese einer onkogenen Wirkung kann durch die vorliegende Arbeit nicht gestützt werden. Die Ergebnisse lassen eher eine Funktion von *RAB3B* als Tumorsuppressorgen vermuten, wie sie von anderen Autoren dem *ALPL* (Niedermayer et al., 1997, Müller et al., 1999) zugeschrieben wird.

6.2.5.3 *ALPL*

Das für die „liver/bone/kidney“-Isoform (gewebeunspezifische Form, *ALPL*) der alkalischen Phosphatase kodierende Gen *ALPL* ist auf Chromosom 1p36.1-p34 lokalisiert (Weiss et al., 1987, Smith et al., 1988). Eine starke *ALPL*-Aktivität im Arachnothel und in meningealen Tumoren ist seit langem bekannt (Landow et al., 1942, Timperley et al., 1970). Typische Meningeomzellen behalten diese Aktivität auch in Kultur bei (Takahara et al., 1982). Neuere Studien weisen einen progressionassozierten Verlust der *ALPL*-Aktivität in Meningeomen nach (Niedermayer et al., 1997, Müller et al., 1999).

Verminderte Aktivität der gewebeunspezifischen Isoform der alkalischen Phosphatase ist seit langem für die hereditäre Erkrankung infantile Hypophosphatasie bekannt. Diese

Erkrankung manifestiert sich mit heterogenem Phänotyp (perinatal, infantil, adult) von unterschiedlichem Schweregrad. Eine Vielzahl genetischer Veränderungen, zumeist missense-Mutationen, aber auch nonsense-Mutationen und Spleißvarianten, konnten in Hypophosphatasiefamilien im Bereich des *ALPL*-Locus detektiert werden (Greenberg et al., 1990, Mornet et al., 1998, Zurutuza et al., 1999).

Die durchgeführte Expressionsanalyse für *ALPL*-Transkripte in Meningeomen ergab eine deutliche Häufung von *ALPL*-Expressionsdefiziten in atypischen und anaplastischen Meningeomen. Dieser progressionsassoziierte *ALPL*-Verlust, der in der vorliegenden Studie in den meisten Tumoren auch auf Proteinebene bestätigt werden konnte, steht in Übereinstimmung mit weiteren Studien, die progressionsassoziierte *ALPL*-Defizite sowohl zytochemisch wie auch immunhistochemisch nachweisen (Niedermayer et al., 1997, Müller et al., 1999). Von den vier Tumoren, in denen mRNA-Expression und Proteinexpression nicht übereinstimmten, fand sich in einem Tumor kein detektables Protein trotz schwacher mRNA-Expression. In diesem Fall könnte ein Fehler in der mRNA-Prozessierung oder aber ein Translationsproblem vorliegen. Schwieriger zu erklären ist der Proteinnachweis bei fehlender mRNA-Detektion in den drei übrigen Tumoren. Denkbar wäre ein komplexer Regulationsmechanismus, bei dem aufgrund eines niedrigen Turnover ein extrem stabiles Protein vorliegt, das seinerseits eine komplette Downregulierung der mRNA-Transkription bewirkt. Interessanterweise konnte mRNA-Verlust wesentlich häufiger nachgewiesen werden als LOH im entsprechenden Bereich. Eine eindeutige Korrelation fand sich nur in den malignen Tumorvarianten. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch die geringe Anzahl der eingesetzten Mikrosatelliten-Marker kleine interstitielle Deletionen nicht erfasst werden konnten.

Das Ergebnis der *ALPL*-Expressionsanalyse unterstützt die von anderen Autoren postulierte mögliche Tumorsuppressorfunktion dieses Gens selbst oder benachbarter genomischer Sequenzen (Niedermayer et al., 1997, Müller et al., 1999). Diskussionsbedürftig bleiben mögliche molekulare Mechanismen, die den vollständigen mRNA-Expressionverlust trotz der morphologischen Präsenz eines intakten Allels erklären.

6.3 Molekulare Mechanismen der funktionellen Inaktivierung eines Gens und seines Produktes

Vollständiges Transkriptionsdefizit ist in der Regel mit dem vollständigen Verlust der Funktion eines Gens gleichzusetzen. Bei Verlust genomischer Sequenzen eines Allels, der sich als LOH manifestiert, ist aufgrund des verbleibenden Allels eine unauffällige, allenfalls reduzierte mRNA- und Proteinexpression zu erwarten. Als Erklärung für die in der vorliegenden Studie nachgewiesenen 1p-spezifischen Transkriptionsdefizite in Meningeomen müssen verschiedene Hypothesen diskutiert werden.

Grundsätzlich ist ein vollständiger Verlust der kodierenden Sequenzen in Erwägung zu ziehen. Dass beide Allele vollständig deletiert sein könnten, erscheint aber relativ unwahrscheinlich.

Desweiteren besteht die Möglichkeit einer inaktivierenden Mutation eines Allels mit nachfolgender Alteration des zweiten Allels. Eine derartige Situation ist seit langem beim Retinoblastom bekannt, bei dem bei primär vorliegender Keimbahnmutation des einen Allels eine sekundäre somatische Mutation einer Retinazelle entsprechend Knudsons „two hit“-Modell zur Entstehung des Tumors führt (Knudson, 1971). Zu den somatischen Mutationen, durch die das zweite *RB*-Allel ausgeschaltet werden kann, zählen Deletionen im *RB*-Locus, der Verlust des gesamten Chromosoms, Punktmutationen, durch die ein Stopp-Codon eingebaut oder die Prozessierung der RNA gestört wird, und illegitime Rekombinationen, die ebenfalls den Verlust des Wildtypallels zur Folge haben.

Mit der Entdeckung, dass „loss of heterozygosity“ an der Tumorigenese einer Vielzahl humaner Tumoren beteiligt ist, rückten auch bei Meningeomen LOH-Studien in den Vordergrund des Interesses. Für zahlreiche Marker auf 1p konnte der Verlust eines Allels bestätigt werden (Jimenez-Lara et al., 1992, Lindblom et al., 1994, Bello et al., 1994b, Weber et al., 1997, Sulman et al., 1998, Leone et al., 1999). Was aber passiert in diesen Fällen mit dem zweiten Allel? Es könnte sich um eine Punktmutation handeln, wie dies für das zweite Allel des *NF2*-Gens in einigen Fällen nachgewiesen werden konnte (Ruttledge et al., 1994b). In neuesten Untersuchungen an Meningeomen mit Verlust des kurzen Arms eines Chromosoms 1 ließen sich im RNA-Transkript des *ALPL*-Gens bisher keine Mutationen nachweisen (Prowald et al., 2002 in Vorbereitung). Auch andere auf 1p lokalisierte Gene, für die eine Tumorsuppressorfunktion in humanen Malignomen postuliert wird, wurden bei bekanntem LOH einer

Mutationsanalyse unterzogen, um die Frage nach dem zweiten Allel zu klären. Für das *p18*-Gen, dessen genomische Lokalisation bei Meningeomen häufig von LOH betroffen ist, ergaben gezielte Mutationsanalysen keinen Hinweis auf somatische Mutationen (Leuraud et al., 2000). Santarius et al. (2000) fanden nur eine stille Mutation des *p18*-Gens, jedoch keine missense-Mutation oder inaktivierende Methylierung. Boström et al. (2001) konnten in einer Studie an 67 größtenteils atypischen und anaplastischen Meningeomen nur in einem Fall eine Alteration des *p18*-Gens detektieren. Im *p73*-Gen, das aufgrund struktureller und funktioneller Ähnlichkeiten mit dem *p53*-Gen als TSG diskutiert wird und dessen genomische Lokalisation bei 1p36.33 auch bei Meningeomen häufig LOH zeigt, konnten ebenfalls keine inaktivierenden Mutationen detektiert werden (Lomas et al., 2001, Alonso et al., 2001), sodass die Autoren eine TSG-Funktion des *p73*-Gens in Meningeomen ablehnen. Eine TSG-Funktion wäre nur durch von dem klassischen „two-hit“-Modell (Knudson, 1971) abweichende molekulare Mechanismen vorstellbar.

Eine weitere Erklärung für den Funktionsverlust des zweiten Allels könnte ein genomisches Imprinting sein, wobei das verbleibende Allel primär inaktiviert ist. Hinweise auf solche Mechanismen in der Pathogenese humaner Malignome finden sich in der Literatur vor allem für embryonale Tumoren, z.B. für den Wilms-Tumor (Williams et al., 1989), das embryonale Rhabdomyosarkom (Scrabble et al., 1989), aber auch für akute und chronische Leukämien (Haas et al., 1992). In Meningeomen mit LOH für Loci auf Chromosom 22 konnte kein Hinweis auf genomisches Imprinting gewonnen werden, das jeweils verbleibende Allel war gleich häufig maternalen wie paternalen Ursprungs (Fontaine et al., 1990).

Liegen mRNA-Expressiondefizite vor, ohne dass LOH in dieser Region zu finden ist, wäre auch eine Konstellation mit dominant-negativer Mutation eines Allels denkbar.

Missense-Mutationen mit dominant-negativem Effekt sind z.B. für *p53* bekannt, wobei die erhöhte Stabilität des mutierten Proteins zur Supprimierung des Wildtyp-Proteins führt. Interessanterweise berichten neueste Untersuchungen über einen kleinen Prozentsatz von Hypophosphatasie-Patienten, bei denen trotz intensiver Studien nur in einem Allel des *ALPL*-Gens eine Mutation gefunden werden konnte, die in einigen dieser Fälle zu einem dominant-negativen Effekt des mutierten Genproduktes auf das intakte Produkt des Wildtypallels führte (Lia-Baldini et al., 2001).

Einige Autoren berichten über Schwannome mit vollständigem Merlin-Verlust trotz zwei intakten *NF2*-Allelen (Stemmer-Rachmaninov, 1997). Als Erklärung für dieses

Phänomen fanden Kimura et al. (1998) eine Proteolyse von Merlin durch Aktivierung calcium-abhängiger Cystein-Proteasen. Offensichtlich kann also auch eine posttranslationale Regulationsstörung Ursache des Funktionsverlustes eines Gens sein und ebenso tumorigen wirksam werden wie der Verlust der entsprechenden kodierenden Sequenzen.

6.4 Methodische Aspekte

Zur Evaluierung molekularer Mechanismen, die in Meningeomwachstum und -progression involviert sind, bieten sich eine Reihe zytogenetischer und molekulargenetischer Methoden an. Die Mehrzahl der bisher zu diesem Thema durchgeführten Studien zielte vor allem auf morphologische Veränderungen der DNA-Ebene ab. Ziel der vorliegenden Studie war, die drei wesentlichen Ebenen in Downstream-Prozess vom Gen zum Protein zu analysieren, um neben der Detektion genomischer Deletionen Hinweise auf mögliche funktionelle Defekte im Transkriptions- und Translationsprozeß zu erhalten.

Mit der Wahl der Transkriptionsebene als Ausgangspunkt der Untersuchung ergaben sich eine Reihe von Vorteilen. Methodisch konnte mit der RT-PCR eine sichere, praktikable Untersuchungstechnik verwendet werden, mit der kleinste Mengen der jeweiligen genomischen Sequenz erkannt und amplifiziert werden können.

Da in dieser Studie kryokonservierte Tumorproben analysiert wurden, konnte nahezu von in-vivo Bedingungen ausgegangen werden. Klassische zytogenetische Analysen erfordern dagegen die Anlage einer Zellkultur, die insbesondere bei langsam wachsenden Tumoren wie Meningeomen in manchen Fällen Schwierigkeiten bereitet. Da Fibroblasten die Kultur überwuchern können, besteht die Gefahr, dass nicht allein der Chromosomensatz der Tumorzellen analysiert wird.

Die vorliegende Untersuchung zielte auf die Expressionsanalyse definierter Gene ab. Es wurden Gene ausgewählt, deren Involvierung in humanes Malignomwachstum bekannt ist, sowie Gene in benachbarter Lokalisation. Dagegen untersuchen LOH-Studien in der Regel nicht einzelne Gene, sondern polymorphe DNA-Marker. Dabei handelt es sich um repetitive Sequenzen, die in Introns oder nicht kodierenden Abschnitten der DNA liegen. Ein Verlust dieser polymorphen Marker ist nicht direkt der Deletion eines Gens zuzuordnen, sodass Zielgene häufiger Deletionen nicht unmittelbar identifiziert werden

können.

Auf mRNA-Ebene sind nichtkodierende Introns bereits durch Prozessierung des primären Transkriptes entfernt, wodurch eine bessere Definition der kodierenden Sequenz erreicht wird. Somit könnte sich eine Transkriptionsanalyse möglicherweise als die aussagekräftigere Methode zur Erfassung definierter genomischer Veränderungen erweisen.

Die mRNA-Expressionsanalyse wurde in dieser Studie ergänzt durch eine Untersuchung auf DNA- und Proteinebene. Eine Mikrosatellitenanalyse wurde eingesetzt, um Monosomie 1p und größere Stückverluste mit Bruchstellen auf 1q zu erfassen. Durch zusätzliche Analyse der Proteinexpression für zwei Gene konnten Transkriptionsdefizite bestätigt werden. Es konnten dadurch aber auch Hinweise gewonnen werden, dass möglicherweise auch posttranskriptionale Regulationsstörungen in der malignen Transformation meningealer Tumoren eine Rolle spielen könnten.

6.5 Weitere molekulare Prognosefaktoren bei Meningeomen

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen daraufhin, dass im Meningeomwachstum 1p-Deletionen progressionsassoziiert auftreten und somit als prognostisch ungünstiger Faktor zu werten sind.

Prognosefaktoren sind von entscheidender Bedeutung vorallem für die 11-15% der Patienten mit benignem Meningeom, die Rezidive erleiden. Sie müssten engmaschiger kontrolliert werden als die übrigen Patienten mit typischen Meningeomen.

Wie die Studie zeigt, scheint die maligne Transformation nicht auf dem Verlust eines einzigen Tumorsuppressorgens zu beruhen. Wahrscheinlicher ist ein komplexer Prozess, der morphologische, funktionelle und regulatorische Alterationen auf mehreren Ebenen beinhaltet.

Neben den hier untersuchten 1p-Deletionen, die als häufigste sekundäre Anomalien bei Meningeomen gelten, sind eine Reihe anderer chromosomaler Veränderungen in Verdacht geraten, an der meningealen Tumorprogression beteiligt zu sein, wie im Abschnitt 2.4.2. dargestellt. Neuere Untersuchungen berichten auch bei Meningeomen von chromosomalen Gewinnen mit fortschreitendem Malignitätsgrad (Khan et al., 1998, Müller et al., 1999, Zang, 2001).

Wie für andere humane Malignome wird auch für Meningeome die Telomerase-Aktivierung als ein entscheidender Schritt in der Progression diskutiert (Simon et al.,

2000, Chen et al., 2000). Telomerase-Aktivierung wird in nahezu allen malignen Meningeomen gefunden, während sie in benignen Tumoren meist nicht detektabel ist (Langford et al., 1997). Durch die Verlängerung der sich physiologisch bei jeder Zellteilung verkürzenden Telomere verhindert das Enzym die Zellalterung und führt zur Immortalisierung der Zellen. Langford et al. (1997) finden in einer kleinen Gruppe benigner Meningeome, dass Telomerase-Aktivität mit schlechterer Prognose dieser Tumoren korreliert.

Diskutiert wird auch der Verlust der Zell-Adäsion durch Alteration von Zelladhäsionsmolekülen wie Integrinen und Cadherinen. Interessanterweise exprimieren maligne Meningeome eine spezifische Integrin-Isoform (Figarella-Branger et al., 1997). Auch scheint progressionsassoziiert in Meningeomen ein Expressionsverlust des Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin vorzuliegen (Schwechheimer et al., 1998).

Ein weiterer Mechanismus, der invasives Wachstum begünstigt, ist die Fähigkeit zur Proteolyse der extrazellulären Matrix. Bekannte proteolytische Enzyme sind die Cystein-Proteasen wie z.B. Cathepsin B, deren Regulation durch spezifische Inhibitoren erfolgt. Sivaparvathi et al. (1996) konnten zeigen, dass in Meningeomzellkulturen die Aktivität der Cystein-Proteasen-Inhibitoren (CPIs) negativ mit dem Malignitätsgrad der Tumorzellen korreliert, sodass auch niedrige CPI-Aktivität ein prognostisch ungünstiges Kriterium in Meningeomen zu sein scheint.

Um den komplexen Vorgang der Tumorprogression in Meningeomen besser zu verstehen, sind eine Vielzahl weiterer Untersuchungen notwendig. Auf lange Sicht ist zu hoffen, dass besseres Verständnis der Pathomechanismen, die der malignen Transformation zugrunde liegen, neben prädiktiven Aussagen auch gezielte therapeutische Konsequenzen zum Wohl des Patienten zur Folge haben wird.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Meningeome, zumeist benigne Neoplasien des ZNS, stellen bis heute in manchen Fällen eine diagnostische und therapeutische Herausforderung dar: Zum einen ist für die kleine Gruppe der atypischen und anaplastischen Tumoren das Grading aufgrund histopathologischer Marker trotz revidierter WHO-Klassifikation schwierig. Zum anderen ist die Rezidivhäufigkeit auch benigner Tumorvarianten ein Problem.

Sichere klinische und histopathologische Diagnosekriterien von prädiktivem Wert für Rezidivhäufigkeit und maligne Transformation sind bisher nicht bekannt. Deshalb haben Prognosefaktoren auf molekularer Ebene in letzter Zeit zunehmend an Bedeutung gewonnen.

Als häufigste chromosomale Veränderung bei Meningeomen wurde die Monosomie 22 oder Teildeletion eines Chromosoms 22 entdeckt. Dabei scheint es sich um den primären Schritt zur Tumorentstehung zu handeln. Der zusätzliche Verlust genomischer Sequenzen auf 1p (LOH) scheint sich signifikant häufiger in atypischen und anaplastischen Meningeomen zu finden und wird deshalb als Prognosefaktor für malignes Wachstumsverhalten diskutiert.

Ziel der vorliegenden Studie war die Expressionsanalyse 1p-spezifischer Transkripte, um funktionelle Konsequenzen von 1p-Deletionen in der Tumorprogression zu untersuchen und daraus diagnostische Marker zur besseren prognostischen Einschätzung zu gewinnen. Zur Validierung der m-RNA-Expression ergänzten eine Analyse der genomischen Ebene mit ausgewählten Mikrosatelliten-Markern und eine Proteinexpressionsanalyse die Untersuchung. Eine zusätzliche immunhistochemische Untersuchung der ALPL-Aktivität diente dazu, die molekulargenetischen Ergebnisse mit Hilfe einer leicht zugänglichen praktisch-diagnostischen Methode zu überprüfen.

Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse zeigten Expressionsdefizite als Hinweis auf genomische Veränderungen gehäuft im Bereich der Gene *ALPL*, *RAB3B* und *GADD45*. Es konnten Zielbereiche der Deletion, aber kein einzelnes Zielgen definiert werden. Die deutliche Konzentration der Transkriptionsdefizite in den WHO II- und III-Tumoren bestätigte die von anderen Autoren beschriebene Progressionsassoziation der 1p-Alterationen in Meningeomen. Die Mikrosatellitenanalyse mit 1p-spezifischen Markern unterstützte den Verlust genomischer Sequenzen in diesem Bereich mit zunehmendem Malignitätsgrad. Die gute Korrelation der ALPL-Expression mit der Transkriptionsanalyse bestärkte die Hypothese genomischer Veränderungen des für

ALPL kodierenden Gens im Rahmen der Tumorprogression. Die immunhistochemische Bestätigung eines progressionsassoziierten ALPL-Verlustes unterstützt die Erfassung eines molekulargenetischen Prognosefaktors mit Hilfe einer der Routinediagnostik leicht zugänglichen Methode. Dagegen ergaben sich für RAB3B divergente Ergebnisse, die auf komplexe Regulationsmechanismen hinweisen könnten.

Die in der Studie nachgewiesenen 1p-spezifischen Transkriptionsdefizite werfen bei Annahme eines intakten Allels die Frage auf, welche molekularen Mechanismen zur vollständigen funktionellen Inaktivierung des Gens führen könnten. Eine mögliche Erklärung liefert Knudson's „two-hit“-Modell, die jedoch in Meningeomen bisher nicht bewiesen werden konnte. Wahrscheinlicher ist ein komplexer Prozess, der morphologische, funktionelle und regulatorische Alterationen auf mehreren Ebenen beinhaltet.

Die prädiktive Bedeutung von 1p-Deletionen bei Meningeomen konnte in dieser Studie bestätigt werden. Wenn es gelänge, diese Erkenntnis im klinischen Alltag nutzbar zu machen, könnten insbesondere rezidivgefährdete Meningeompatienten davon profitieren.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Aaronson DS, Horvath CM (2002) A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296: 1653-1655
- 2 Adekbite AB, Khan MI, Paine KWE, Tan LK (1983) The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurosurg* 58: 51-56
- 3 Akagi K, Kurahashi H, Arita N, Hayakawa T, Monden M, Mori T, Takai S, Nishisho I (1995) Deletion mapping of the long arm of chromosome 22 in human meningiomas. *Int J Cancer* 60: 178-182
- 4 Al Saadi A, Latimer F, Madercic M, Robbins T (1987) Cytogenetic Studies of Human Brain Tumors and Their Clinical Significance. II Meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 26: 127-141
- 5 Alonso ME, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P, Lomas J, Arjona D, de Campos JM, Kusak ME, Sarasa JL, Isla A, Rey JA (2001) Mutation analysis of the p73 gene in nonastrocytic brain tumors. *Br J Cancer* 85: 204-208
- 6 Antinheimo J, Sankila R, Carpén O, Pukkala E, Sainio M, Jääskeläinen J (2000) Population-based analysis of sporadic and type 2 neurofibromatosis-associated meningiomas and schwannomas. *Neurology* 54: 71-82
- 7 Aringer A, Cheng A, Nelson JM, Chen M, Sudarshan C, Zhou YJ, O'Shea JJ (1999) Janus Kinases and their role in growth and disease. *Life Sci* 64: 2173-2186
- 8 Bale SJ, Dracopoli NC, Tucker MA, Clark WH, Fraser MC, Stanger BZ, Green P, Donis-Keller H, Housman DE, Greene MH (1989) Mapping the gene for hereditary cutaneous malignant melanoma-dysplastic nevus to chromosome 1p. *N Engl J Med* 320: 1367-1372
- 9 Barille S, Bataille R, Amiot M (2000) The role of interleukin-6 and interleukin-6/interleukin-6 receptor-alpha complex in the pathogenesis of multiple myeloma. *Eur Cytokine Netw* 11: 546-551
- 10 Bar-Sagi D, Feramisco JR (1986) Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science* 233: 1061-1068
- 11 Battersby RDE, Ironside JW, Maltby EL (1986) Inherited multiple meningiomas: A clinical, pathological and cytogenetic study of an affected family. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49: 362-368
- 12 Baud V, Karin M (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11: 372-377
- 13 Baumgartner JE, Sorenson JM (1996) Meningioma in the pediatric population. *J Neurooncol* 29: 223-228

- 14 Befort K, Mattei MG, Roeckel N, Kieffer B (1994) Chromosomal localization of the delta opioid receptor gene to human 1p34.3-p36.1 and mouse 4D bands by in situ hybridization. *Genomics* 20: 143-145
- 15 Bello J, Leone PE, Vaquero J, De Campos JM, Kusak ME, Sarasa JL, Pestaña A, Rey JA (1995) Allelic Loss at 1p and 19q frequently occurs in association and may represent early oncogenic events in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 64: 207-210
- 16 Bello J, Leone PE, Vaquero J, De Campos JM, Kusak ME, Sarasa JL, Saez-Castresana, Pestaña A, Rey JA (1994a) Molecular Analysis of Chromosome 1 Abnormalities in Human Gliomas Reveals Frequent Loss of 1p in Oligodendroglial Tumors. *Int J Cancer* 57: 172-175
- 17 Bello MJ, de Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Sarasa A, Pestaña A, Rey JA (1994b) Allelic Loss at 1p Is Associated With Tumor Progression of Meningiomas. *Genes, Chromosomes & Cancer* 9: 296-298
- 18 Bello MJ, deCampos JM, Vaquero J, Kusak ME, Sarasa JL, Rey JA (2000) High-Resolution Analysis of Chromosome Arm 1p Alterations in Meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 120: 30-36
- 19 Beltinger CP, White PS, Maris JM, Sulman EP, Jensen SJ, LePaslier D, Stallard BJ, Goeddel DV, de Sauvage FJ, Brodeur GM (1996) Physical mapping and genomic structure of the human TNFR2 gene. *Genomics* 35: 94-100
- 20 Berube D, Simard J, Sandberg M, Grzeschik KH, Gagne R, Hansson V, Jahnsen T (1991) Assignment of the gene encoding the catalytic subunit C (beta) of cAMP-dependent protein kinase to the p36 band on chromosome 1. (Abstract) *Cytogenet Cell Genet* 58: 1991
- 21 Bezieau S, Devilder MC, Avet-Loiseau H, Mellerin MP, Puthier D, Pennarun E, Rapp MJ, Harousseau JL, Moisan JP, Batille R (2001) High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Hum Mutat* 18: 212-224
- 22 Bickerstaff ER, Small JM, Guest IA (1958) The relapsing course of certain meningiomas in relation to pregnancy and menstruation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 21: 89-91
- 23 Bieche I, Champeme MH, Matifas F, Cropp CS, Callahan R, Lidereau R (1993) Two Distinct Regions Involved in 1p Deletion in Human Primary Breast Cancer. *Cancer Res* 53: 1990-1994
- 24 Bitzer M, Opitz H, Popp J, Morgalla M, Gruber A, Heiss E, Voigt K (1998) Angiogenesis and Brain Oedema in Intracranial Meningiomas: Influence of Vascular Endothelial Growth Factor. *Acta Neurochir (Wien)* 140: 333-340
- 25 Boström J, Mühlbauer A, Reifenberger G (1997) Deletion mapping of the short arm of chromosome 1 identifies a common region of deletion distal to D1S496 in human meningiomas. *Acta Neuropathol* 94: 479-485

- 26 Boström J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, Ichimura K, Collins VP, Reifenberger G (2001) Alterations of the Tumor Suppressor Genes *CDKN2A* (p16^{INK4a}), p14^{ARF}, *CDKN2B* (p15^{INK4b}), and *CDKN2C* (p18^{INK4c}) in Atypical and Anaplastic Meningiomas. *Am J Pathol* 159: 661-669
- 27 Bourne HR, Sanders DA, McCormick (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348: 125-132
- 28 Bourne HR, Sanders DA, McCormick (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349: 117-127
- 29 Bradac GB, Ferszt R, Bender A, Schörner W (1986) Peritumoral edema in meningiomas. A radiological and histological study. *Neuroradiology* 28: 304-312
- 30 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7: 248-254
- 31 Brodeur GM, Green AA, Hayes FA, Williams KJ, Williams DL, Tsatis AA (1981) Cytogenetic Features of Human Neuroblastomas and Cell Lines. *Cancer Res* 41: 4678-4686
- 32 Büschges R, Bostöm J, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, Collins VP, Reifenberger (2001) Analysis of human meningiomas for aberrations of the *MADH2*, *MADH4*, *APM-1* and *DCC* tumor suppressor genes on the long arm of chromosome 18. *Int J Cancer* 92: 551-554
- 33 Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM (1993) Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res* 53: 1312-1316
- 34 Carrier F, Smith ML, Bae I, Kilpatrick KE, Lansing TJ, Chen CY, Engelstein M, Friend SH, Henner WD, Gilmer TM, Kastan MB, Fornace AJ Jr (1994) Characterization of human Gadd45, a p53-regulated protein. *J Biol Chem* 269: 32672-32677
- 35 Chaganti, RSK, Balazs I, Jhanwar SC, Murty VVVS, Koduru PRK, Grzeschik KH, Stavnezer E (1986) The cellular homologue of the transforming gene of SKV avian retrovirus maps to human chromosome region 1q22-q24. *Cytogenet Cell Genet* 43: 181-186
- 36 Chan RC, Thompson GB (1984) Morbidity, mortality, and quality of life following surgery for intracranial meningiomas. *J Neurosurg* 60: 52-60
- 37 Cheah MSC, Ley TJ, Tronick SR, Robbins KC (1986) Fgr proto-oncogen mRNA induced in B lymphocytes by Epstein-Barr virus infection. *Nature* 319: 238-240
- 38 Chen HJ, Liang CL, Lu K, Lin JW, Cho CL (2000) Implication of Telomerase Activity and Alterations of Telomere Length in the Histologic Characteristics of Intracranial Meningiomas. *Cancer* 89: 2092-2098

- 39 Cho KG, Hoshino T, Nagashima T, Murovic JA, Wilson CB (1986) Prediction of tumor doubling time in recurrent meningiomas. Cell kinetics studies with bromodeoxyuridine labeling. *J Neurosurg* 65: 790-794
- 40 Collins VP, James CD (1993) Gene and chromosomal alterations associated with the development of human gliomas. *FASEB J* 7: 926-930
- 41 Colmenares C, Heilstedt HA, Shaffer LG, Schwartz S, Berk M, Murray JC, Stavnezer E (2002) Loss of the SKI proto-oncogene in individuals affected with 1p36 deletion syndrome is predicted by strain-dependent defects in Ski $-/-$ mice. *Nature Genet* 30: 106-109
- 42 Crouse SK, Berg BO (1972) Intracranial meningiomas in childhood and adolescence. *Neurology* 22: 135-141
- 43 De Ridder LI, Calliauw LJ (1992) Invasiveness in in vitro and clinical evaluation of meningiomas. *Surg Neurol* 37: 269-273
- 44 De Vitis LR, Tedde A, Vitelli F, Ammannati F, Mennonna P, Bigozzi U, Montali E, Papi L (1996) Screening for mutations in the neurofibromatosis type 2 (NF2) gene in sporadic meningiomas. *Hum Genet* 97: 632-637
- 45 Deen HG Jr, Scheithauer BW, Ebersold MJ (1982) Clinical and pathological study of meningiomas of the first two decades of life. *J Neurosurg* 56: 317-322
- 46 Domenicucci M, Santoreo A, D'Osvaldo DH, Delfini R, Cantore GP, Guidetti B (1989) Multiple intracranial meningiomas. *J Neurosurg* 70: 41-44
- 47 Downward J (1990) The ras superfamily of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 15: 469-472
- 48 Dracopoli NC, Harnett P, Bale SJ, Stanger BZ, Tucker MA, Housman DE, Kefford RF (1989) Loss of alleles from the distal short arm of chromosome 1 occurs late in melanoma progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4614-4618
- 49 Dumanski JP, Rouleau GA, Nordenskjöld M, Collins VP (1990) Molecular Genetic analysis of Chromosome 22 in 81 Cases of Meningioma. *Cancer Res* 50: 5863-5867
- 50 Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pironr R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L (1996) MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGF- β -regulated MAD-related Protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 86: 543-552
- 51 Evans JJ, Jeun SS, Lee JH, Harwalkar JA, ShoshanY, CowellJK, Golubic M (2001) Molecular alterations in the *neurofibromatosis Type 2* gene and ist protein rarely occuring in meningotheial meningiomas. *J Neurosurg* 94: 111-117
- 52 Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, Vogelstein B (1990a) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247: 49-56

-
- 53 Fearon ER, Vogelstein B (1990b) A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767
- 54 Figarella-Branger D, Roche PH, Daniel L, Dufour H, Bianco N (1997) Cell-adhesion molecules in human meningiomas: correlation with clinical and morphological data. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23: 113-122
- 55 Finger LR, Kagan J, Christopher G, Kurtzberg J, Hershfield MS, Nowell PC, Croce CM (1989) Involvement of the TLC5 gene on human chromosome 1 in T-cell leukemia and melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5039-5043 Genetics
- 56 Fischer W, Müller E (1970) Untersuchungen über die alkalische Phosphatase in Meningeomen. *Enzym Biol Clin Basel* 11: 450-458
- 57 Flejter WL, Li FP, Antman KH, Testa JR (1989) Recurring Loss Involving Chromosomes 1,3 and 22 in Malignant Mesothelioma: Possible Sites of Tumor Suppressor Genes. *Genes Chromosomes & Cancer* 1: 148-154
- 58 Fonatsch C, Latza U, Durkop H, Rieder H, Stein H (1992) Assignment of the human CD30 (Ki-1) gene to 1p36. *Genomics* 14: 825-826
- 59 Fontaine B, Rouleau GA, Seizinger B, Jewell AF, Hanson, Martuza RL, Gusella JF (1990) Equal Parental Origin of Chromosome 22 Losses in Human Sporadic Meningioma: No Evidence for Genomic Imprinting. *Am J Hum Genet* 47: 823-827
- 60 Francke U, de Martinville B, Coussens L, Ullrich A (1983) The human gene for the beta subunit of nerve growth factor is located on the proximal short arm of chromosome 1. *Science* 222: 1248-125
- 61 Gado K, Domjan G, Hegyesi H, Falus A (2000) Role of INTERLEUKIN-6 in the pathogenesis of multiple myeloma. *Cell Biol Int* 24: 195-209
- 62 Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31: 13-20
- 63 Germano IM, Edwards MSB, Davis RL, Schiffer D (1994) Intracranial meningiomas of the first two decades of life. *J Neurosurg* 80: 447-453
- 64 Goldstein D, Rogers CE, Harris H (1980) Expression of alkaline phosphatase loci in mammalian tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2857-2860
- 65 Greco A, Pierotti MA, Bongarzone I, Pagliardini S, Lanzi C, Della Porta G (1992) TRK-T1 is a novel oncogene formed by fusion of TPR and TRK genes in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 7: 237-242
- 66 Greenberg CR, Evans JA, McKendry-Smith S, Redekopp S, Haworth JC, Mulivor R, Chodirker BN (1990) Infantile Hypophosphatasia: Localization within Chromosome Region 1p36.1-34 and Prenatal Diagnosis Using Linked DNA Markers. *Am J Hum Genet* 46: 286-292

-
- 67 Greenberg MS (1994) Meningiomas. In: Greenberg MS (Ed) Handbook of Neurosurgery 3rd Edition, Greenberg Graphics Inc. Chapter 46.2.4, pp 620-623
- 68 Grunewald JP, Röhl FW, Kirches E, Dietzmann K (1998) Correlation of DNA Content and Nucleomorphometric Features with World Health Organization grading of Meningiomas. *Mod Pathol* 11: 216-223
- 69 Gutmann DH, Donahoe J, Perry A, Lemke N, Gorse K, Kittiniyom K, Rempel SA, Gutierrez JA, Newsham IF (2000) Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. *Hum Mol Genet* 9: 1495-1500
- 70 Gutmann DH, Giordano MJ, Fishback AS, Guha A (1997) Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependymomas and schwannomas. *Neurology* 49: 267-270
- 71 Haas OA, Argyriou-Trita A, Lion T (1992) Parental origin of chromosomes involved in the translocation t(9;22). *Nature* 359: 414-416
- 72 Hall A (1990) The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 249: 635-640
- 73 Haluska FG, Huebner K, Isobe M, Nishimura T, Croce CM, Vogt PK (1988) Localization of the human JUN protooncogene to chromosome region 1p31-32. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2215-2218
- 74 Harrison MJ, Wolfe DE, Lau TS, Mitnick RJ, Sachdev VP (1991) Radiation-induced meningiomas: experience at the Mount Sinai Hospital and review of the literature. *J Neurosurg* 75: 564-574
- 75 Hattori K, Angel P, Le Beau MM, Karin M (1988) Structure and chromosomal localization of the functional intronless human JUN protooncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9148-9152
- 76 Helseth A, Mørk SJ, Glatre E (1989) Neoplasms of the central nervous system in norway. V. Meningioma and cancer of other sites. An analysis of the occurrence of multiple primary neoplasms in meningioma patients in norway from 1955 through 1986. *APMIS* 97: 738-744
- 77 Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350: 678-683
- 78 Hirano T, Ishihara K, Hibi M (2000) Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 19: 2548-56
- 79 Hollander MC, Sheikh MS, Bulavin DV, Lundgren K, Augeri-Henmueller L, Shehee R, Molinaro TA, Kim KE, Tolosa E, Ashwell JD, Rosenberg MP, Zhan Q, Fernandez-Salguero PM, Morgan WF, Deng CX, Fornace AJ, Jr (1999) Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nature Genet* 23: 176-184

-
- 80 Horn F, Henze C, Heidrich K (2000) Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function. *Immunobiol* 202: 151-67
- 81 Hsu DW, Efird JT, Hedley-Whyte ET (1997) Progesterone and oestrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. *J Neurosurg* 86: 113-120
- 82 Ihle JN (1995) Cytokine receptor signalling. *Nature* 377: 591-594
- 83 Ikeda K, Saeki Y, Gonzalez-Agosti C, Ramesh V, Chiocca EA (1999) Inhibition of NF2-negative and NF2-positive primary human meningioma cell proliferation by overexpression of merlin due to vector-mediated gene transfer. *J Neurosurg* 91: 85-92
- 84 Ishino S, Hashimoto N, Fushiki S, Date K, Mori T, Fujimoto M, Nakagawa Y, Ueda S, Abe T, Inazawa J (1998) Loss of Material from Chromosome Arm 1p during Malignant Progression of Meningioma Revealed by Fluorescent In Situ Hybridization. *Cancer* 83: 360-366
- 85 Jääskeläinen J (1986) Seemingly complete removal of histologically benign intracranial meningioma: late recurrence rate and factors predicting recurrence in 657 patients. *Surg Neurol* 26: 461-469
- 86 Jacobs DH, McFarlane MJ, Holmes FF (1987) Female patients with meningioma of the sphenoid ridge and additional primary neoplasms of the breast and genital tract. *Cancer* 60: 3080-3082
- 87 James CD, He J, Carlbom E, Mikkelsen T, Ridderheim PA, Cavenee WK, Collins VP (1990) Loss of Genetic Information in Central Nervous System Tumors Common to Children and Young Adults. *Genes Chromosomes & Cancer* 2: 94-102
- 88 Jiménez-Lara A, Rey JA, Bello MJ, Campos de JM, Vaquero J, Kusak ME, Pestana A (1992) Cytogenetics of human meningiomas: an analysis of 125 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 63: 174
- 89 Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM (2001) The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J* 15: 43-58
- 90 Jost CA, Marin MC, Kaelin WG Jr (1997) p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389: 191-194
- 91 Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90: 809-819
- 92 Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF (1991) Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the *trk* proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 350: 158-160

- 93 Kearsley JM, Coates PJ, Prescott AR, Warbrick E, Hall PA (1995) Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21(Cip1). *Oncogene* 11: 1675-1683
- 94 Ketter R, Henn W, Niedermayer I, Steilen-Gimbel H, König J, Zang KD, Steudel WI (2001) Predictive value of progression-associated chromosomal aberrations for the prognosis of meningiomas: a retrospective study of 198 cases. *J Neurosurg* 95: 601-607
- 95 Khan J, Parsa NZ, Harada T, Meltzer PS, Carter NP (1998) Detection of Gains and Losses in 18 Meningiomas by Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 103: 95-100
- 96 Kimura Y, Koga H, Araki N, Mugita N, Fujita N, Takeshima H, Nishi T, Yamashima T, Saido TC, Yamasaki T, Moritake K, Saya H, Nakao M (1998) The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nature Med* 4: 915-922
- 97 Kluck PMC, Wiegant J, Jansen RPM, Bolk MWJ, Raap AK, Willemze R, Landegent JE (1993) The human interleukin-6 receptor alpha-chain gene is localized on chromosome 1 band q21. *Hum Genet* 90: 542-544
- 98 Knudson AG (1993) Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10914-10921
- 99 Knudson JR. AG (1971) Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 820-823
- 100 Kolles H, Niedermayer I, Schmitt Ch, Henn W, Feld R, Steudel WI, Zang KD, Feiden W (1995) Triple Approach for Diagnosis and Grading of Meningiomas: Histology, Morphometry of Ki-67/Feulgen Stainings, and Cytogenetics. *Acta Neurochir* 137: 174-181
- 101 Kraus JA, Albrecht S, Wiestler OD, Schweinitz von D, Pietsch T (1996) Loss of Heterozygosity on Chromosome 1 in Human Hepatoblastoma. *Int J Cancer* 67: 467-471
- 102 Kros J, de Greve K, van Tilborg A, Hop W, Pieterman H, Avezaat C, Lekanne dit Deprez R, Zwarthoff E (2001) NF2 status of meningiomas is associated with tumor localization and histology. *J Pathol* 194: 367-372
- 103 Kuroki T, Fujiwara Y, Tsuchiya E, Nakamori S, Imaoka S, Kanematsu T, Nakamura Y (1995) Accumulation of Genetic Changes During Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma: Loss of Heterozygosity on Chromosome Arm 1p Occurs at an Early Stage of Hepatocarcinogenesis. *Genes, Chromosomes & Cancer* 13: 163-167
- 104 Kurts C, Carbone FR, Krummel MF, Koch KM, Miller JFAP, Heath WR (1999) Signalling through CD30 protects against autoimmune diabetes mediated by CD8 T cells. *Nature* 398: 341-344

- 105 Lahiri M, Sehgal S, Kak VK, Banerjee AK (2001) Flowcytometric and Histopathologic Correlation of Primary Intracranial Neoplasms. *Neurol India* 49: 124-127
- 106 Landow H, Kabat EA, Newman W (1942) Distribution of alkaline phosphatase in normal and in neoplastic tissues of the nervous system. *Arch Neurol* 48: 518-538
- 107 Langford LA, Piatyszek MA, Xu R, Schold SC, Wright WE, Shay JW (1997) Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts poor outcome. *Hum Pathol* 28: 416-420
- 108 Lapresle J, Zimmermann HM (1952) The pathology of meningiomas: a study of 212 cases. *Am J Pathol* 28: 757-791
- 109 Lauta VM (2001) Interleukin-6 and the network of several cytokines in multiple myeloma: an overview of clinical and experimental data. *Cytokine* 16: 79-86
- 110 Lee KS, Hoshino T, Rodriguez LA, Bederson J, Davis RL, Wilson CB (1990) Bromodeoxyuridine labeling study of intracranial meningiomas: proliferative potential and recurrence. *Acta Neuropathol (Berl)* 80: 311-317
- 111 Lekanne Deprez RH, Bianchi AB, Groen NA, Seizinger BR, Hagemeijer A, van Drunen E, Bootsma D, Koper JW, Avezaat CJJ, Kley N, Zwarthoff EC (1994) Frequent NF2 Gene Transkript Mutations in Sporadic Meningiomas and Vestibular Schwannomas. *Am J Hum Genet* 54: 1022-1029
- 112 Lekanne Deprez RH, Riegman PH, van Drunen E, Warringa UL, Groen NA, Stefanko SZ, Koper JW, Avezaat CJJ, Mulder PGH, Zwarthoff EC, Hagemeijer A (1995) Cytogenetic, Molecular Genetic and Pathological Analyses in 126 Meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 54: 224-235
- 113 Leone PE, Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J, Sarasa JL, Pestana A, Rey JA (1999) NF2 gene mutations and allelic status of 1p, 14q and 22q in sporadic meningiomas. *Oncogene* 18: 2231-2239
- 114 Leuraud P, Marie Y, Robin E, Huguet S, He J, Mokhtari K, Cornu P, Hoang-Xuan K, Sanson M (2000) Frequent loss of 1p32 region but no mutation of the *p18* tumor suppressor in meningiomas. *J Neurooncol* 50: 207-213
- 115 Levi-Montalcini, R (1987) The nerve growth factor thirty-five years later. *Science* 237: 1154-1162
- 116 Lia-Baldini AS, Muller F, Taillandier A, Gibrat JF, Mouchard M, Robin B, Simon-Bouy B, Serre JL, Aylsworth AS, Bieth E, Delanote S, Freisinger P, Hu, JCC, Krohn HP, Nunes ME, Mornet E (2001) A molecular approach to dominance in hypophosphatasia. *Hum Genet* 109: 99-108
- 117 Lin CG, Lin YC, Liu HW, Kao LS (1997) Characterization of Rab3A, Rab3B and Rab3C: different biochemical properties and intracellular localization in bovine chromaffin cells. *Biochem J* 324: 85-90

- 118 Lindblom A, Rutledge M, Collins VP, Nordenskjöld M, Dumanski P (1994) Chromosomal deletions in anaplastic meningiomas suggest multiple regions outside chromosome 22 as important in tumor progression. *Int J Cancer* 56: 354-357
- 119 Lloyd AC, Paterson HF, Morris JD, Hall A, Marshall CJ (1989) p21H-ras-induced morphological transformation and increases in c-myc expression are independent of functional protein kinase C. *EMBO J* 8: 1099-1104
- 120 Logan JA, Seizinger BR, Atkins L, Martuza RL (1990) Loss of the Y Chromosome in Meningiomas - A molecular Genetic Approach. *Cancer Genet Cytogenet* 45: 41-47
- 121 Lomas J, Bello MJ, Arjona D, Gonzalez-Gomez P, Alonso ME, De Campos JM, Vaquero J, Ruiz-Barnes P, Sarasa JL, Casartelli C, Rey JA (2001) Analysis of p73 gene in meningiomas with deletion at 1p. *Cancer Genet Cytogenet* 129: 88-91
- 122 Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A, Kepes JJ: Meningiomas, in Kleihues P, Cavenee W (eds): Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. World Health Organization Classification of Tumours (IARC Press, Lyon 1989)
- 123 Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A, Kepes JJ: Meningiomas, in Kleihues P, Cavenee W (eds): Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. World Health Organization Classification of Tumours (IARC Press, Lyon 1993)
- 124 Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A, Kepes JJ: Meningiomas, in Kleihues P, Cavenee W (eds): Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. World Health Organization Classification of Tumours (IARC Press, Lyon 2000)
- 125 Mack EE, Wilson CB (1993) Meningiomas induced by high-dose cranial irradiation. *J Neurosurg* 79: 28-31
- 126 Magrassi L, De-Fraja C, Conti L, Butti G, Infuso L, Govoni S, Cattaneo E (1999) expression of the JAK and STAT superfamilies in human meningiomas. *J Neurosurg* 91: 440-446
- 127 Maier H, Öfner D, Hittmair A, Kitz K, Budka H (1992) Classic, atypical, and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance. *J Neurosurg* 77: 616-623
- 128 Maltby EL, Ironside JW, Battersby RDE (1988) Cytogenetic Studies in 50 Meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 31: 199-210
- 129 Mantle RE, Lach B, Delgado MR, Baeesa S, Belanger G (1999) Predicting the probability of meningioma recurrence based on the quantity of peritumoral brain edema on computerized tomography scanning. *J Neurosurg* 91: 375-383
- 130 Mark J, Levan G, Mitelman F (1972) Identification by fluorescence of the G chromosome lost in human meningiomas. *Hereditas* 71: 163-168

- 131 Martinsson T, Sjöberg RM, Hedborg F, Kogner P (1995) Deletion of Chromosome 1p Loci and Microsatellite Instability in Neuroblastomas Analyzed with Short-Tandem Repeat Polymorphisms. *Cancer Res* 55: 5681-5686
- 132 Martin-Zanca D, Oskam R, Mitra G, Copeland T, Barbacid M (1989) Molecular and biochemical characterization of the human TRK proto-oncogene. *Molec Cell Biol* 9: 24-33
- 133 Martuza RL, Eldridge R (1988) Neurofibromatosis 2 (Bilateral Acoustic Neurofibromatosis). *N Engl J Med* 318: 684-688
- 134 Mayer P, Tischmeyer H, Jayasinghe M, Bonnekoh B, Gollnick H, Teschemacher H, Holtt V (2000) A delta-opioid receptor lacking the third cytoplasmatic loop is generated by atypical mRNA processing in human malignomas. *FEBS Lett* 480: 156-160
- 135 Meese E, Blin N, Zang KD (1987) Loss of heterozygosity and the origin of meningioma. *Hum Genet* 77: 349-351
- 136 Menon AG, Rutter JL, von Sattel JP, Synder H, Murdoch C, Blumenfeld A, Martuza RL, von Deimling A, Gusella JF, Houseal TW (1997) Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative 'tumor progression' locus. *Oncogene* 14: 611-616
- 137 Mertens F, Johansson B, Höglund M, Mitelman F (1997) Chromosomal Imbalance Maps of Malignant Solid Tumors: A Cytogenetic Survey of 3185 Neoplasms. *Cancer Res* 57: 2765-2780
- 138 Mirimanoff RO, Dosoretz DE, Linggood RM, Ojemann RG, Martuza RL (1985) Meningioma: analysis of recurrence and progression following neurosurgical resection. *J Neurosurg* 62: 18-24
- 139 Mitchell ELD, Jones D, White GRM, Varley JM, Santibanez Koref MF (1995) Determination of the gene order of the three loci CD2, NGFB, and NRAS at human chromosome band 1p13 and refinement of their localisation at the subband level by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 70: 183-185
- 140 Mitelman F, Mertens F, Johansson B (1997) A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nature Gen* 15: 417-477
- 141 Miyaki M, Seki M, Okamoto M, Yamanaka A, Maeda Y, Tanaka K, Kikuchi R, Iwama T, Ikeuchi T, Tonomura A, Nakamura Y, White R, Miki Y, Utsunomiya J, Koike M (1990) Genetic Changes and Histopathological Types in Colorectal Tumors from Patients with Familial Adenomatous Polyposis. *Cancer Res* 50: 7166-7173
- 142 Modi WS, Farrar WL, Howard OMZ (1995) Confirmed assignment of a novel tyrosine kinase gene (JAK1A) to 1p32.3-p31.3 by nonisotopic in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 69: 232-234

- 143 Mornet E, Taillandier A, Peyramaure S, Kaper F, Muller F, Brenner R, Bussiere P, Freisinger P, Godard J, Le Merrer M, Oury JF, Plauchu H, Puddu R, Rival JM, Superti-Furga A, Touraine RL, Serre JL, Simon-Bouy B (1998) Identification of fifteen novel mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP) gene in European patients with severe hypophosphatasie. *Eur J Hum Genet* 6: 308-314
- 144 Morris CM, Hao QL, Heisterkamp N, Fitzgerald PH, Groffen J (1991) Localization of the TRK proto-oncogene to human chromosome bands 1q23-1q24. *Oncogene* 6: 1093-1095
- 145 Müller M, Briscoe J, Laxton C, Guschin D, Ziemiecki A, Silvennoinen O, Harpur AG, Barbieri G, Witthuhn BA, Schindler C, Pellegrini S, Wilks AF, Ihle JN, Stark GR, Kerr IM (1993) The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon- α/β and γ signal transduction. *Nature* 366: 129-135
- 146 Müller P, Henn W, Niedermayer I, Ketter R, Feiden W, Steudel WI, Zang KD, Steilen-Gimbel H (1999) Deletion of Chromosome 1p and Loss of Expression of Alkaline Phosphatase Indicate Progression of Meningiomas. *Clin Cancer Res* 5: 3569-3577
- 147 Niedermayer I, Feiden W, Henn W, Steilen-Gimbel H, Steudel WI, Zang KD (1997) Loss of Alkaline Phosphatase Activity in Meningiomas: A Rapid Histochemical Technique Indicating Progression-associated Deletion of a Putative Tumor Suppressor Gene on the Distal Part of the Short Arm of Chromosome (1997) *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 879-886
- 148 Niedermayer I, Kolles H, Zang KD, Feiden W (1996) Characterization of intermediate type (WHO „atypical“) meningiomas. *Clinical Neuropathol* 15: 330-336
- 149 Ohta M, Iwaki T, Kitamoto T, Takeshita I, Tateishi J, Fukui M (1994) MIB-1 Staining Index and Scoring of Histologic Features in Meningioma. *Cancer* 74: 3176-3189
- 150 Oláh É, Balogh E, Kovács I, Kiss A (1989) Abnormalities of Chromosome 1 in Relation to Human Malignant Diseases. *Cancer Genet Cytogenet* 43: 179-194
- 151 Papathanasiou MA, Kerr NCK, Robbins JH, McBride OW, Alamo I Jr, Barrett SF, Hickson ID, Fornace AJ Jr (1991) Induction by ionizing radiation of the GADD45 gene in cultured human cells: lack of mediation by protein kinase C. *Molec Cell Biol* 11: 1009-1016
- 152 Paule B (2001) [Interleukin-6 and bone metastasis of renal cancer: molecular bases and therapeutic implications] [Article in French] *Prog Urol* 11:368-75
- 153 Perrot-Applanat M, Groyer-Picard MT, Kujas M (1992) Immunocytochemical study of progesterone receptor in human meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)* 115: 20-30

- 154 Perry A, Cai DX, Scheithauer BW, Swanson PE, Lohse CM, Newsham IF, Weaver A, Gutmann DH (2000) Merlin, DAL-1, and Progesterone Receptor Expression in Clinicopathologic Subsets of Meningioma: A Correlative Immunohistochemical Study of 175 Cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 72-879
- 155 Perry A, Jenkins RB, Dahl RJ, Moertel CA, Scheithauer BW (1996) Cytogenetic Analysis of Aggressive Meningiomas – Possible Diagnostic and Prognostic Implications. *Cancer* 77: 2567-2573
- 156 Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM (1998) The Prognostic Significance of MIB-1, p53, and DNA Flow Cytometry in Completely Resected Primary Meningiomas. *Cancer* 82: 2262-2269
- 157 Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM (1997) Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol* 21: 1455-1465
- 158 Peyrard A, Fransson I, Xie YG, Hand FY, Rutledge MH, Swahn S, Collins JF, Dunham I, Collins VP, Dumanski JP (1994) Characterization of the a new member of the human beta-adaptin gene family from chromosome 22q12, a candidate meningioma gene. *Hum Molec Genet* 3: 1393-1399
- 159 Peyrard M, Seroussi E, Sandberg-Nordquist AC, Xie YG, Han FY, Fransson I, Collins J, Dunham I, Kost-Alimova M, Imreh S, Dumanski JP (1999) The human *LARGE* gene from 22q12.3-q13.1 is a new, distinct member of the glycosyltransferase gene family. *Proc Natl Acad Sci* 96: 598-603
- 160 Piiper A, Leser J, Lutz MP, Beil M, Zeuzem S (2001) Subcellular distribution and function of Rab3A-D in pancreatic acinar AR42J cells. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 746-51
- 161 Prowald A, Vater K, Ketter R, Freiler A, Henn W, Zang KD, Steudel WI (2002) Down-regulation of the expression of tissue-unspecific alkaline phosphatase enzyme (EC 3.1.3.1) during progression of meningiomas. *Kongressheft DGNC*
- 162 Rabin M, Watson M, Barker PE, Ryan J, Breg WR, Ruddle FH (1984) NRAS transforming gene maps to region p11-p13 on chromosome 1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 38: 70-72
- 163 Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP (1994) Molecular Genetic Analysis of Oligodendroglial Tumors Shows Preferential Allelic Deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 145: 1175-1190
- 164 Remmele W, Stegner HE (1987) Recommendation for uniform definition of a immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe* 8: 138-140
- 165 Rempel SA, Schwechheimer K, Davis RL, Cavenee WK, Rosenblum ML (1993) Loss of Heterozygosity for Loci on Chromosome 10 Is Associated with Morphologically Malignant Meningioma Progression. *Cancer Res* 53: 2386-2392

- 166 Reuter S, Bartelmann M, Vogt M, Geisen C, Napierski I, Kahn T, Delius H, Lichter P, Weitz S, Korn B, Schwarz E (1998) *APM-1*, a novel human gene, identified by aberrant co-transcription with papillomavirus oncogenes in a cervical carcinoma cell line, encodes a BTB/POZ-zinc finger protein with inhibitory activity. *EMBO J* 17: 215-222
- 167 Rey JA, Bello MJ, de Campos JM, Kusak E, Moreno S (1988a) Chromosomal Involvement Secondary to -22 in Human Meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 33: 275-290
- 168 Rey JA, Bello MJ, de Campos JM, Kusak ME (1988b) Incidence and Origin of Dicentric Chromosomes in Cultured Meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 35: 55-60
- 169 Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, King KL, Sheehan KCF, Yin L, Pennica D, Johnson EM Jr, Schreiber RD (1998) Disruption of the *Jak1* gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 93: 373-383
- 170 Roggendorf W, Schuster T, Pfeiffer J (1987) Proliferative potential of meningiomas determined with the monoclonal antibody Ki-67. *Acta Neuropathol* 73: 361-364
- 171 Ron E, Modan B, Boice JD, Alfandary E, Stovall M, Chetrit A, Katz L (1988) Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *New Engl J Med* 319: 1033-1039
- 172 Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, Hoang-Xuan K, Demczuk S, Desmaze C, Plougastel B, Pulst SM, Lenoir G, Bijlsma E, Fashold R, Dumanski J, de Jong P, Parry D, Eldridge R, Aurias A, Delattre O, Thomas G (1993) Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 363: 515-521
- 173 Rouleau GA, Seizinger BR, Wertelecki W, Haines JL, Superneau DW, Martuza RL, Gusella JF (1990) Flanking Markers Bracket the Neurofibromatosis Type 2 (NF2) Gene on Chromosome 22. *Am J Hum Genet* 46: 323-328
- 174 Rousseau-Merck ME, Zahraoui A, Bernheim A, Touchot N, Tavitian A, Berger R (1991) Chromosome assignment of four RAS-related RAB genes. *Hum Genet* 86: 350-354
- 175 Rubinstein AB, Shalit MN, Cohen ML, Zandbank U, Reichenthal E (1984) Radiation-induced cerebral meningioma: a recognizable entity. *J Neurosurg* 61: 699-671
- 176 Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjöld M, Collins VP, Dumanski JP, Rouleau GA (1994b) Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat genet* 6: 180-184

- 177 Rutledge MH, Xie YG, Han FY, Peyrard M, Collins VP, Nordenskjöld M, Dumanski P (1994a) Deletions on Chromosome 22 in sporadic Meningioma. *Genes, Chromosomes & Cancer* 10: 122-130
- 178 Sadetzki S, Flint-Richter P, Ben-Tal T, Nass D (2002) Radiation-induced meningioma: a descriptive study of 253 cases. *J Neurosurg* 97: 1078-1082
- 179 Salhany KE, Collins RD, Greer JP, Kinney MC (1991) Long-term survival in Ki-1 lymphoma. *Cancer* 67: 516-522
- 180 Sambrook J, Frisch EF and Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 181 Santarius T, Kirsch M, Nikas DC, Imitola J, Black PM (2000) Molecular analysis of alterations of the p18^{INK4c} gene in human meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26: 67-75
- 182 Scheithauer BW (1990) Tumors of the meninges: proposed modifications of the World Health Organization classification. *Acta Neuropathol* 80: 343-354
- 183 Schlegel J, Ullrich B, Stumm G, Gass P, Harwerth IM, Hynes NE, Kiessling M (1993) Expression of the c-erbB-2-encoded oncoprotein and progesterone receptor in human meningiomas. *Acta Neuropathol* 86: 473-479
- 184 Schoenberg BS, Christine BW, Whisnant JP (1975) Nervous system neoplasms and primary malignancies of other sites: the unique association between meningiomas and breast cancer. *Neurology* 25: 705-712
- 185 Schrell UMH, Adams EF, Fahlbusch R, Greb R, Jirikowski G, Prior R, Ramalho-Ortigao FJ (1990) Hormonal dependency of cerebral meningiomas. *J Neurosurg* 73: 743-755
- 186 Schwechheimer K, Zhou L, Birchmaier W (1998) E-Cadherin in human brain tumors: loss of immunoreactivity in malignant meningiomas. *Virchows Arch* 432: 163-167
- 187 Scoles DR, Huynh DP, Morcos PA, Coulsell ER, Robinson NG, Tamanoi F, Pulst SM (1998) Neurofibromatosis 2 tumour suppressor schwannomin interacts with betaII-spectrin. *Nat Genet* 18: 354-359
- 188 Scrable H, Cavenee W, Ghavimi F, Lovell M, Morgan K, Sapienza C (1989) A model for embryonal rhabdomyosarcoma tumorigenesis that involves genome imprinting. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7480-7484
- 189 Seizinger BR, De La Monte S, Atkins L, Gusella JF, Martuza RL (1987a) Molecular genetic approach to human meningioma: Loss of genes on chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5419-5423
- 190 Seizinger BR, Rouleau G, Ozelius LJ, Lane AH, St George-Hyslop P, Hudson S, Gusella JF, Martuza RL (1987b) Common Pathogenetic Mechanism for Three Tumor Types in Bilateral Acoustic Neurofibromatosis. *Science* 236: 317-319

- 191 Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FFB, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer LG (1997) Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet* 61: 642-650
- 192 Shaulian E, Schreiber M, Piu F, Beeche M, Wagner EF, Karin M (2000) The mammalian UV-Response: c-Jun is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell* 103: 897-907
- 193 Sherman L, Xu HM, Geist RT, Saporito-Irwin S, Howells N, Ponta H, Herrlich P, Gutmann DH (1997) Interdomain binding mediates tumor growth suppression by the NF2 gene product. *Oncogene* 15: 2505-2509
- 194 Shibuya M, Hoshino T, Ito S, Wacker MR, Prados MD, Davis RL, Wilson CB (1992) Meningiomas: clinical implications of a high proliferative potential determined by bromodeoxyuridine labeling. *Neurosurgery* 30: 497-498
- 195 Shinagawa T, Nomura T, Colmenares C, Ohira M, Nakagawara A, Ishii S (2001) Increased susceptibility to tumorigenesis of ski-deficient heterozygous mice. *Oncogene* 20: 8100-8108
- 196 Simard J, Berube D, Sandberg M, Grzeschik KH, Gagne R, Hansson V, Jahnsen T (1992) Assignment of the gene encoding the catalytic subunit C-beta of cAMP-dependent protein kinase to the p36 band on chromosome 1. *Cytogenet Cell Genet* 88: 653-657
- 197 Simon M, Park TW, Leuenroth S, Hans VHJ, Löning T, Schramm J (2000) Telomerase activity and expression of the telomerase catalytic subunit, hTERT, in meningioma progression. *J Neurosurg* 92: 832-840
- 198 Simon M, von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther R, Kaskel P, Waha A, Warnik RE, Tew JM Jr., Menon AG (1995) Allelic Losses on Chromosome 14, 10, and 1 in Atypical and Malignant Meningiomas: A Genetic Model of Meningioma Progression. *Cancer Res* 55: 4696-4701
- 199 Simpson D (1957) The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20: 22-39
- 200 Sivaparvathi M, McCutcheon I, Sawaya R, Nicolson GL, Rao JS (1996) Expression of cysteine protease inhibitors in human gliomas and meningiomas. *Clin Exp Metastasis* 14: 344-350
- 201 Slavotinek A, Shaffer LG, Shapira SK (1999) Monosomy 1p36. *J Med Genet* 36: 657-663
- 202 Smith M, Weiss MJ, Griffin CA, Murray JC, Buetow KH, Emanuel BS, Henthorn PS, Harris H (1988) Regional assignment of the gene for human liver/bone/kidney alkaline phosphatase to chromosome 1p36.1-p34. *Genomics* 2: 139-143

- 203 Smith ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace AJ Jr (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 266: 1376-1380
- 204 Smith PC, Hobisch A, Lin DL, Culig Z, Keller ET (2001) Interleukin-6 and prostate cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev* 12: 33-40
- 205 Soffer D, Pittaluga S, Feiner M, Beller AJ (1983) Intracranial meningiomas following low-dose irradiation to the head. *J Neurosurg* 59: 1048-1053
- 206 Stacey DW, Watson T, Kung HF, Curran T (1987) Microinjection of transforming ras protein induces c-fos expression. *Mol Cell Biol* 7: 523-527
- 207 Stemmer-Rachmaninov AO, Xu L, Gonzalez-Agosti C, Burwick J, Pinney D, Beauchamp R, Jacoby LB, Gusella JF, Ramesh V, Louis DN (1997) Universal absence of merlin, but not other ERM family members, in schwannomas. *Am J Pathol* 151: 1649-1654
- 208 Sulman EP, Dumanski JP, White PS, Zhao H, Maris JM, Mathiesen T, Bruder C, Cnaan A, Brodeur GM (1998) Identification of a Consistent Region of Allelic Loss on 1p32 in Meningiomas: Correlation with Increased Morbidity. *Cancer Res* 58: 3226-3230
- 209 Sun Y, Liu X, Eaton EN, Lane WS, Lodish HF, Weinberg RA (1999) Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signaling. *Molec Cell* 4: 499-509
- 210 Sunshine C, Francis S, Kirk KL (2000) Rab3B regulates ZO-1 targeting and actin organization in PC12 neuroendocrine cells. *Exp Cell Res* 257: 1-10
- 211 Takahara N, Herz F, Hirano A (1982) Alkaline Phosphatase Activity in Cultured Meningioma Cells. *Acta Neuropathol* 57: 45-50
- 212 Takayama H, Suzuki T, Mugishima H, Fujisawa T, Ookuni M, Schwab M, Gehring M, Nakamura Y, Sugimura T, Terada M, Yokota J (1992) Deletion mapping of chromosome 14q and 1p in human neuroblastoma. *Oncogene* 7: 1185-1189
- 213 Tanaka K, Yanoshita R, Konishi M, Oshimura M, Maeda Y, Mori T, Miyaki M (1993) Suppression of tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of the normal chromosome 1p36 region. *Oncogene* 8: 2253-2258
- 214 Tanaka N, Nishisho I, Yamamoto M, Miya A, Shin E, Karakawa K, Fujita S, Kobayashi T, Rouleau GA, Mori T, Takai S (1992) Loss of Heterozygosity on the Long Arm of Chromosome 22 in Pheochromocytoma. *Genes Chromosomes & Cancer* 5: 399-403
- 215 Tilzer LL, Plapp FV, Evans JP, Stone D, Alward K (1982) Steroid receptor proteins in human meningiomas. *Cancer* 49: 633-636

- 216 Timperley WR, Warnes TW (1970) Alkaline Phosphatase in Meningiomas. *Cancer* 26: 100-103
- 217 Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJ Jr, DiStefano PS, Chiang LW, Greenberg ME (2002) DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 296: 530-534
- 218 Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrel JR, Duyao MP, Parry DM, Eldridge R, Kley N, Menon AG, Pulaski K, Haase VH, Ambrose CM, Munroe D, Bove C, Haines JL, Martuza RL, MacDonald ME, Seizinger BR, Short MP, Buckler AJ, Gusella JF (1993) A Novel Moesin-, Ezrin-, Radixin-like Gene Is a Candidate for the Neurofibromatosis 2 Tumor Suppressor. *Cell* 72: 791-800
- 219 Tronick SR, Popescu NC, Cheah MSC, Swan DC, Amsbaugh SC, Lengel CR, DiPaola JA, Robbins KC (1985) Isolation and chromosomal localization of the *fgf* protooncogene, a distinct member of the tyrosine kinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6595-6599
- 220 Wang XW, Zhan Q, Coursen JD, Khan MA, Kontny HU, Yu L, Hollander MC, O'Connor PM, Fornace AJ, Harris CC (1999) GADD45 induction of a G₂/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3706-3711
- 221 Weber RG, Boström J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G, Lichter P (1997) Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: Toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14719-14724
- 222 Weiss M, Smith M, Griffin C, Nussbaum R, Murray J, Emanuel B, Harris H (1987) Assignment of the gene encoding the liver/bone/kidney form of alkaline phosphatase *ALPL* to the region 1p34-p36.1. *Cytogenet Cell Genet* 47: 714
- 223 Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon A, Schramm J, Louis DN, Rames V, Gusella JF, Wiestler OD, von Deimling A (1995) Analysis of the Neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 146: 827-832
- 224 Williams JC, Brown KW, Mott MG, Maitland NJ (1989) Maternal allele loss in Wilms' tumor. *Lancet* 1: 283-284
- 225 Wolff RK, Frazer KA, Jackler RK, Lanser MJ, Pitts LH, Cox DR (1992) Analysis of Chromosome 22 Deletions in Neurofibromatosis Type 2-related Tumors. *Am J Hum Genet* 51: 478-485
- 226 Yamasaki F, Yoshioka H, Hama S, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K (2000) Recurrence of Meningiomas- *Influence of Vascular Endothelial Growth Factor Expression*. *Cancer* 89: 1102-1110
- 227 Yeh SH, Chen PJ, Chen HL, Lai MY, Wang CC, Chen DS (1994) Frequent genetic alterations at the distal region of chromosome 1p in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 54: 4188-4192

- 228 Yoshioka H, Hama S, Taniguchi E, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K (1999) Peritumoral Brain Edema Associated with Meningioma - *Influence of Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Vascular Blood Supply*. *Cancer* 85: 936-944
- 229 Younis GA, Sawaya R, DeMonte F, Hess KR, Albrecht S, Bruner JM (1995) Aggressive meningeal tumors: review of a series. *J Neurosurg* 82: 17-27
- 230 Zabel BU, Eddy RL, Lalley PA, Scott J, Bell GI, Shows TB (1985) Chromosomal locations of the human and mouse genes for precursors of epidermal growth factor and the beta subunit of nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 469-473
- 231 Zahraoui A, Touchot N, Chardin P, Tavitian A (1989) The human rab genes encode a family of GTP-binding proteins related to yeast YPT1 and SEC4 products involved in secretion. *J Biol Chem* 264: 12394-12401
- 232 Zang KD (2001) Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet* 93: 207-220
- 233 Zang KD, Singer H (1967) Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature* 216: 84-85
- 234 Zankl H and Zang KD (1980) Correlation between Clinical and Cytogenetical Data in 180 Human Meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1: 351-356
- 235 Zankl H, Zang KD (1972) Cytological and cytogenetical studies on brain tumors: IV. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as no. 22 by fluorescence technique. *Humangenetik* 14: 167-169
- 236 Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ (1995) Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. *Nature* 377: 348-351
- 237 Zurutuza L, Muller F, Gibrat JF, Taillandier A, Simon-Bouy B, Serre JL, Mornet E (1999) Correlations of genotype and phenotype in hypophosphatasia. *Hum Molec Genet* 8: 1039-1046

DANKSAGUNG

An Herrn Prof. Dr. H. Bertalanffy richtet sich mein sehr herzlicher Dank für die Möglichkeit, an seiner Klinik wissenschaftlich tätig zu sein.

Frau Dr. med. Elena Uhle gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und die Unterstützung vorallem in klinischen Fragestellungen.

Herrn Prof. Dr. med. H.D. Mennel danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit, die wissenschaftlichen Experimente im Labor der Neuropatholgischen Abteilung durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Schlegel. Seine sorgfältige wissenschaftliche Anleitung und seine konstruktiven Ratschläge haben wesentlich zur Förderung meiner Arbeit beigetragen. Auch nach seinem Wechsel an die Abteilung für Neuropathologie der TU-München war er durch persönliches Engagement und ständige Hilfsbereitschaft eine große Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Abteilung für Neuropathologie der Philipps-Universität Marburg und besonders bei meinen Mitdoktoranden für die stets gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Charakterisierung molekulargenetischer Prognosefaktoren auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 in humanen Meningeomen“ in der Klinik für Neurochirurgie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. med. H. Bertalanffy mit Unterstützung durch Frau Dr. med. E. Uhle ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Juni 2002 auf dem Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie in Form eines Posters präsentiert.

Mainz, Februar 2004

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Damen/Herren in Marburg:

Prof. Dr.	Arnold
Prof. Dr.	Aumüller
Prof. Dr. Dr.	Austermann
Prof. Dr. Dr.	Basler
Prof. Dr.	Behr
Prof. Dr.	Bertalanffy
Prof. Dr.	Bien
Prof. Dr. Dr.	Daut
Frau Prof. Dr.	Engenhardt-Carbillic
Prof. Dr.	Gotzen
Prof. Dr.	Griß
Prof. Dr.	Happle
Prof. Dr.	Hasilik
Prof. Dr.	Hofmann
Prof. Dr.	Klenk
Prof. Dr.	Klose
Prof. Dr.	Koolman
Prof. Dr.	Krause
Prof. Dr.	Kretschmer
Prof. Dr.	Krieg
Prof. Dr.	Kroll
Prof. Dr.	Löffler
Prof. Dr.	Maisch
Prof. Dr.	Mennel
Prof. Dr.	Moll
Prof. Dr.	Moosdorf
Prof. Dr. Dr.	Mueller
Prof. Dr.	Neubauer
Prof. Dr.	Oertel
Prof. Dr. Dr.	Remschmidt
Prof. Dr.	Röhm
Prof. Dr.	Rothmund
Prof. Dr.	Schlegel
Prof. Dr.	Schulz
Prof. Dr.	Seitz
Prof. Dr.	Seyberth
Prof. Dr.	Vogelmaier
Prof. Dr.	Voigt
Prof. Dr.	Weihe
Prof. Dr.	Werner
Prof. Dr.	Wulf